

**Der Einfluss von CTLA-4 Polymorphismen auf die
Rezidivrate, die transplantations-assoziierte Letalität und
das Überleben nach allogener hämatopoetischer
Stammzelltransplantation im Kindesalter**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät

der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Judith Hammrich

geboren am 17.02.1994

in Marktrechwitz

Gutachter:

1. Prof. Dr. Bernd Gruhn, Jena
2. Prof. Dr. Sebastian Scholl, Jena
3. Prof. Dr. Ingo Müller, Hamburg

Erhalt der Approbation:

19. Dezember 2018

Tag der öffentlichen Verteidigung:

06. Juli 2020

Abkürzungsverzeichnis:

| | |
|--------|--|
| A | Adenin |
| aGVHD | Akute Graft-versus-Host Erkrankung |
| AML | Akute myeloische Leukämie |
| ALL | Akute lymphoblastische Leukämie |
| AP-1 | Activator protein 1 |
| APC | Antigen-präsentierende Zelle |
| C | Cytosin |
| CD | Cluster of Differentiation |
| cGVHD | Chronische Graft-versus-Host Erkrankung |
| CML | Chronische myeloische Leukämie |
| CTLA-4 | Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4 |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DRST | Deutsches Register für Stammzelltransplantation |
| EFS | Ereignis-freies Überleben |
| EGIL | European Group for the Immunological Characterization of Leukemias |
| FAB | French-American-British |
| G | Guanin |
| GvHD | Graft-versus-Host Erkrankung |
| GvL | Graft-versus-Leukemia |
| HLA | Humanes Leukozyten-Antigen |

| | |
|-------|--|
| HSZT | Hämatopoetische Stammzelltransplantation |
| IL | Interleukin |
| INF | Interferon |
| JMML | Juvenile myelomonozytäre Leukämie |
| MHC | Haupthistokompatibilitätskomplex |
| NF-AT | Nuclear factor of activated T-cells |
| NFkB | Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells |
| OS | Gesamtüberleben |
| RR | Rezidivrate |
| SNP | Einzelnukeotid-Polymorphismus |
| T | Thymin |
| TRM | Transplantations-assoziierte Letalität |
| WHO | World Health Organization |

Inhaltsverzeichnis:

| | |
|--|-----------|
| 1. Zusammenfassung | 1 |
| 2. Einleitung | 3 |
| 2.1. Leukämien im Kindesalter | 3 |
| 2.1.1. Akute lymphoblastische Leukämie | 3 |
| 2.1.2. Akute myeloische Leukämie | 4 |
| 2.1.3. Juvenile myelomonozytäre Leukämie | 5 |
| 2.2. Allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation | 5 |
| 2.3. Das Immunsystem im Überblick | 6 |
| 2.3.1. Angeborene und erworbene Immunantwort | 6 |
| 2.3.2. B-Zellen und Immunglobuline | 7 |
| 2.3.3. T-Zell-Funktion | 9 |
| 2.4. Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4 (CTLA-4) | 11 |
| 2.5. Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) | 12 |
| 3. Ziele der Arbeit | 14 |
| 4. Publierte Originalarbeiten | 15 |
| 4.1. CTLA-4 polymorphisms: Influence on transplant-related mortality and survival in children undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation | 15 |
| 4.2. CTLA-4 polymorphism rs231775: Influence on relapse and survival after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in childhood | 21 |
| 5. Diskussion | 27 |
| 5.1. rs3087243 (CT60) SNP | 27 |
| 5.2. rs231775 (+49G/A) SNP | 29 |
| 6. Schlussfolgerungen | 31 |
| 7. Literaturverzeichnis | 32 |
| 8. Anhang | 39 |
| 8.1. Ehrenwörtliche Erklärung | 39 |
| 8.2. Curriculum Vitae | 40 |
| 8.3. Danksagung | 41 |

Abbildungsverzeichnis:

Abbildung 1: Elemente des angeborenen und erworbenen Immunsystems

Abbildung 2: Antikörper

Abbildung 3: T-Zell Aktivierung

Abbildung 4: Interaktionsmöglichkeiten zwischen T-Zelle und APC

Abbildung 5: Einzelnukleotid-Polymorphismus

1. Zusammenfassung

Im Kindesalter sind Leukämien mit circa einem Drittel die häufigste Krebserkrankung. Die akute lymphoblastische Leukämie (ALL) macht unter den Leukämien mit etwa zwei Dritteln den größten Anteil aus. Die meisten Kinder können durch eine Chemotherapie kurativ behandelt werden. Es gibt jedoch Patienten, welche ein aggressiveres Therapieregime benötigen. Für diese ist die allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSZT) eine wirksame Therapie. Dennoch wird der Erfolg durch Rezidive, die Graft-versus-Host-Disease (GVHD) und die Transplantations-assoziierte Letalität (TRM) limitiert. Um das Risiko für genannte Komplikationen möglichst gering zu halten, ist die Auswahl des optimalen Spenders essenziell. Neben bereits standardisierten Screening-Faktoren wie der HLA-Typisierung stehen zunehmend molekulare Aspekte im Zentrum der aktuellen Forschung. Die HSZT ist ein immenser Eingriff in das Immunsystem des Patienten: Zuerst werden über Polychemotherapie und gegebenenfalls Strahlentherapie die malignen Zellen eradiziert und dabei auch das eigene Immunsystem supprimiert. Im Anschluss werden fremde immunkompetente Zellen in den Patienten eingebracht, welche nachfolgend alle wichtigen Funktionen der Selbsterkennung und Abwehr übernehmen sollen. Ein wichtiger Bestandteil des Immunsystems sind die T-Zellen, welche wiederum zahlreichen Regulationsmechanismen unterliegen. Ein bedeutender Inhibitor der T-Zellen, auch als Checkpoint-Inhibitor bezeichnet, ist das Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4 (CTLA-4). Es wird auf den T-Zellen exprimiert und interagiert mit den Antigen-präsentierenden Zellen (APCs). Nachdem es gelungen war, das gesamte menschliche Genom zu kartieren, wurde auch das CTLA-4 Genom genauer analysiert. Mittels neuartiger Forschungsmethoden konnten sogar Folgen des Austauschs einzelner Basen, sogenannter Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs), untersucht werden. Wir analysierten retrospektiv kryokonservierte Proben von Leukämie-Patienten und deren Spendern, welche an der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin am Universitätsklinikum Jena eine allogene HSZT erhielten. Es zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem CT60 SNP des CTLA-4 und der TRM sowie dem Ereignis-freien Überleben (EFS). Die TRM war mit 9,1 % gegenüber 19,2 % (AG) und 35,5 % (AA) signifikant geringer, wenn die Patienten Stammzellen vom Spender-Genotyp GG erhielten.

Dies erklärten wir uns, in Einklang mit zahlreichen anderen Publikationen, welche sich auf adulte Patientenskollektive stützen, folgendermaßen: Liegt der Genotyp GG vor, wird das Verhältnis der beiden CTLA-4 Isotypen fCTLA-4 und sCTLA-4 so reguliert, dass einerseits eine hinreichende Infektabwehr gesichert ist. Andererseits wird durch die ausreichende Inhibition der T-Zellen das Risiko für das Auftreten einer GVHD oder des Multiorganversagens herabgesetzt.

Darüber hinaus zeigte sich bei unseren Analysen ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem +49A/G SNP und der Rezidivrate (RR) nach Transplantation sowie dem EFS. Erhielten die Leukämie-Patienten Stammzellen von einem Spender mit mindestens einem G-Allel, war die RR signifikant niedriger als bei Vorliegen des homozygoten AA-Allels. Das G-Allel resultiert vermutlich in einer verminderten Aktivität des CTLA-4. Als Folge dessen werden die T-Zellen weniger inhibiert, sodass der Graft-versus-Leukemia (GvL)-Effekt verstärkt wirkt.

Somit konnten wir einen signifikanten Zusammenhang zwischen den SNPs CT60 und +49A/G und dem Erfolg der allogenen HSZT bei pädiatrischen Leukämie-Patienten feststellen. In größeren, multizentrischen Studien wäre zu evaluieren, ob die SNP-Analyse als Screening Parameter für die Auswahl des optimalen Spenders geeignet wäre. Des Weiteren wäre zu prüfen, ob sich die SNPs eignen, die Erfolgchancen der allogenen HSZT im Kindesalter zu verbessern.

2. Einleitung

2.1. Leukämien

2.1.1. Akute lymphoblastische Leukämie

Die akute lymphoblastische Leukämie (ALL) ist, wie schon oben angemerkt, mit einem Anteil von 30 Prozent die häufigste maligne Erkrankung im Kindesalter. Sie ist definiert als eine Proliferation klonaler maligner lymphatischer Zellen mit Befall des Knochenmarks (Mayatepek 2019). Der Häufigkeitsgipfel liegt zwischen dem 2. und 5. Lebensjahr. Die Überlebensrate beträgt circa 90 Prozent (Santiago et al. 2017). Im peripheren Differenzialblutbild zeigen sich meist eine normozytäre Anämie, eine Thrombozytopenie sowie leukämische Blasten. Im Knochenmark-Aspirat ist eine vollständige Verdrängung der normalen Hämatopoese durch monomorphe Leukämiezellen festzustellen.

Neben der morphologischen Klassifikation nach dem French-American-British-System in FAB L1-3 gibt es noch die Klassifikation der European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL), bei der die Leukämien mittels Durchflusszytometrie anhand ihrer Oberflächenantigene (Cluster of Differentiation, CD) eingeteilt werden. Die common-ALL mit dem CD10 Antigen ist der häufigste Subtyp im Kindesalter. Außerdem sind genetische Merkmale für die Beschreibung einer Leukämie bedeutsam. Die Translokation t (9;22) mit dem sogenannten Philadelphia Chromosom beispielsweise ist bei der ALL in aller Regel mit einer schlechten Prognose assoziiert (Mayatepek 2019). 2016 erschien diesbezüglich die 4. Auflage der WHO Klassifikation, welche alle bis dato neuen Erkenntnisse einbezog (Arber et al. 2016).

Klinisch äußert sich die ALL meist durch Anzeichen der Anämie, Blutungszeichen und protrahierte Infekte. Weitere Symptome sind Lymphknotenschwellungen, Hepatosplenomegalie sowie Knochen- und Gelenkschmerzen. Kritische Komplikationen sind unter anderem das Tumorlyse-Syndrom oder Komplikationen der Leukostase.

Die Therapie erfolgt größtenteils mittels einer Kombination aus Polychemotherapie und Steroiden. Nach der Evaluation des individuellen Risikoprofils wird die Intensität der Behandlung festgelegt. Patienten mit sehr hohem Risiko (beispielsweise mit Translokation t (9;22) oder t (4;11)) erhalten in Abhängigkeit des molekularen Therapieansprechens eine HSZT. Auch Patienten mit einem Rezidiv und ungünstigem Risikoprofil oder unzureichendem

Ansprechen auf die Induktionstherapie sollten eine HSZT erhalten (Mayatepek 2019; AWMF 2016; Eckert et al. 2013; Bader et al. 2015; Vardiman et al. 2009).

2.1.2. Akute myeloische Leukämie

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist definiert als eine klonale Proliferation maligner nichtlymphatischer hämatologischer Vorläuferzellen. Die AML ist mit 0,7 Erkrankungen auf 100.000 Einwohner unter dem 15. Lebensjahr wesentlich seltener als die ALL. Die traditionelle Klassifikation nach dem FAB-System wird zunehmend von der WHO-Klassifikation, in welcher die genetischen Veränderungen eine stärkere Gewichtung haben, abgelöst (Arber et al. 2016; AWMF 2019). Die AML kann sich aus einem myelodysplastischem Syndrom entwickeln oder - im Kindesalter häufiger - primär entstehen. Bei Kindern wird ab einem Blastenanteil von 30 Prozent in der Knochenmarksstanze von einer AML gesprochen. Die Symptome der AML, verursacht durch Störung der normalen Hämatopoese und klonalen Proliferation einer Zellreihe, entsprechen im Grundlegenden denen der ALL. Die Therapie besteht in einer intensiven, in der Regel blockförmigen Polychemotherapie. Aufgrund der hohen Toxizität mit langer Knochenmarksaplasie sind schwere (Pilz-) Infektionen eine gefürchtete Komplikation (Mayatepek 2019; AWMF 2019). Anhand der AML-BFM Studien erfolgte 2012 eine neue Risikoeinteilung, nach der nur noch Patienten mit ungünstiger Zytogenetik und/oder schlechtem Therapieansprechen in erster Remission transplantiert werden. Bei Rezidiven bleibt die HSZT die einzige kurative Therapieoption (Reinhardt et al. 2012). Antikörper-gesteuerte Medikamente oder Tyrosinkinase-Inhibitoren werden in derzeit laufenden Studien (Pediatric Relapsed AML 2010/01 und AML-BFM 2012) als neue Therapieoptionen der AML geprüft. Die 5-Jahres Überlebensrate der AML liegt bei circa 60-75 Prozent (Creutzig et al. 2011).

2.1.3. Juvenile myelomonozytäre Leukämie

Die juvenile myelomonozytäre Leukämie wird den myelodysplastischen Syndromen zugeordnet (Arber et al. 2016). Diese sind charakterisiert durch die klonale Proliferation von ausdifferenzierten, aber funktionsunfähigen Zellen der Hämatopoese. Die JMML kommt gehäuft bei Kindern mit Neurofibromatose Typ 1 oder Noonan-Syndrom vor (O'Halloran et al. 2017). Bei etwa 90 Prozent der Leukämie-Zellen liegen Mutationen im Ras/Raf/MAPK-Signalweg vor (Sakashita, Matsuda, and Koike 2016). Klinisch weisen die Patienten Blässe, Hepatosplenomegalie und Blutungszeichen auf. Laborchemisch sind meist eine Anämie, eine Thrombozytopenie und eine Monozytose nachzuweisen (Mayatepek 2019). Die einzige kurative Behandlung ist die HSZT. Zytostatische Therapieansätze sind Gegenstand experimenteller Studien (Sakashita, Matsuda, and Koike 2016). Die Wahrscheinlichkeit, 5 Jahre ereignisfrei zu überleben, beträgt nach HSZT circa 50 Prozent (Locatelli et al. 2005). Eine Ausnahme stellen Patienten mit Noonan-Syndrom dar, bei welchen Fallberichte nahelegen, dass die Erkrankung gutartig verlaufen kann (O'Halloran et al. 2017; Mayatepek 2019).

2.2. Allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation

Die Übertragung von Stammzellen einer anderen Person auf einen Patienten wird als allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSZT) bezeichnet. Das Prinzip der allogenen HSZT besteht darin, ein defektes oder funktionsloses Immunsystem, beispielsweise eines Leukämie-Patienten, durch das eines gesunden Spenders zu ersetzen.

Zu Beginn der Spendersuche steht die Typisierung der Humanen Leukozyten-Antigene, in erster Linie je beide Allele von HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1 und HLA-DQB1. Sind die genannten HLA-Merkmale von Spender und Empfänger identisch, spricht man von einer HLA-kompatiblen Transplantation (Middeke and Schetelig 2018; Einsele and Kanz 1999).

Spender erster Wahl sind dabei stets HLA-identische Geschwister, da das Risiko für eine Graft-versus-Host Erkrankung (GVHD) im Vergleich zu den übrigen Alternativen am geringsten ist (Horowitz 2012; Shaw et al. 2010). Stehen diese

nicht zur Verfügung, wird über das Deutsche Register für Stammzelltransplantation (DRST) gesucht. Bei HLA-kompatiblen Fremdspendern sind Überleben, TRM und RR mit dem HLA-identischen Geschwister vergleichbar (Lozano Cerrada, Altaf, and Olavarria 2018). Wird im Register kein HLA-kompatibler Spender gefunden, kann eine gewisse Merkmalsdifferenz akzeptiert werden. Diese geht allerdings mit einem erhöhten Risiko von Abstoßung oder GVHD einher. Eine weitere Option stellt die haplo-identische Transplantation dar, bei welcher ein Spender nur in entweder dem mütterlichen oder dem väterlichen Allel übereinstimmt.

Laut Jahresbericht des DRST waren von den 1998-2017 insgesamt 5144 Spendern für ALL-Patienten 65,7 % Fremdspender, 27,7 % HLA-identische Verwandte und 6,6 % haplo-identische Verwandte (DRST 2018).

Die Stammzellen können entweder durch eine Knochenmarkpunktion, aus dem peripheren Blut nach Verabreichung von Wachstumsfaktoren (G-CSF) oder aus Nabelschnurblut gewonnen werden.

Vor der eigentlichen Transplantation erhält der Patient eine Konditionierung. Diese Chemo- und gegebenenfalls zusätzliche Strahlentherapie soll die malignen Zellen eradizieren und das Immunsystem des Patienten supprimieren.

Nach erfolgter Stammzelltransplantation erhalten die Patienten eine medikamentöse Immunsuppression, um eine akute Abstoßungsreaktion und eine GVHD zu verhindern (Middeke and Schetelig 2018; Hemmati 2018).

2.3. Das Immunsystem im Überblick

2.3.1. Angeborene und erworbene Immunantwort

Die Aufgabe des Immunsystems besteht darin, den Körper vor Pathogenen, Toxinen und Allergenen zu schützen. Wird eine Zelle als infiziert oder fremd erkannt, werden auf humoraler und zellulärer Ebene Mechanismen des angeborenen und erworbenen Immunsystems aktiviert. Zum angeborenen Immunsystem gehören unter anderem die Granulozyten, die Monozyten und die natürlichen Killerzellen sowie das Komplementsystem. Das erworbene Immunsystem besteht aus den von den B-Zellen sezernierten Immunglobulinen und den T-Zellen (Cota and Midwinter 2015; Chaplin 2010). Siehe Abbildung 1.

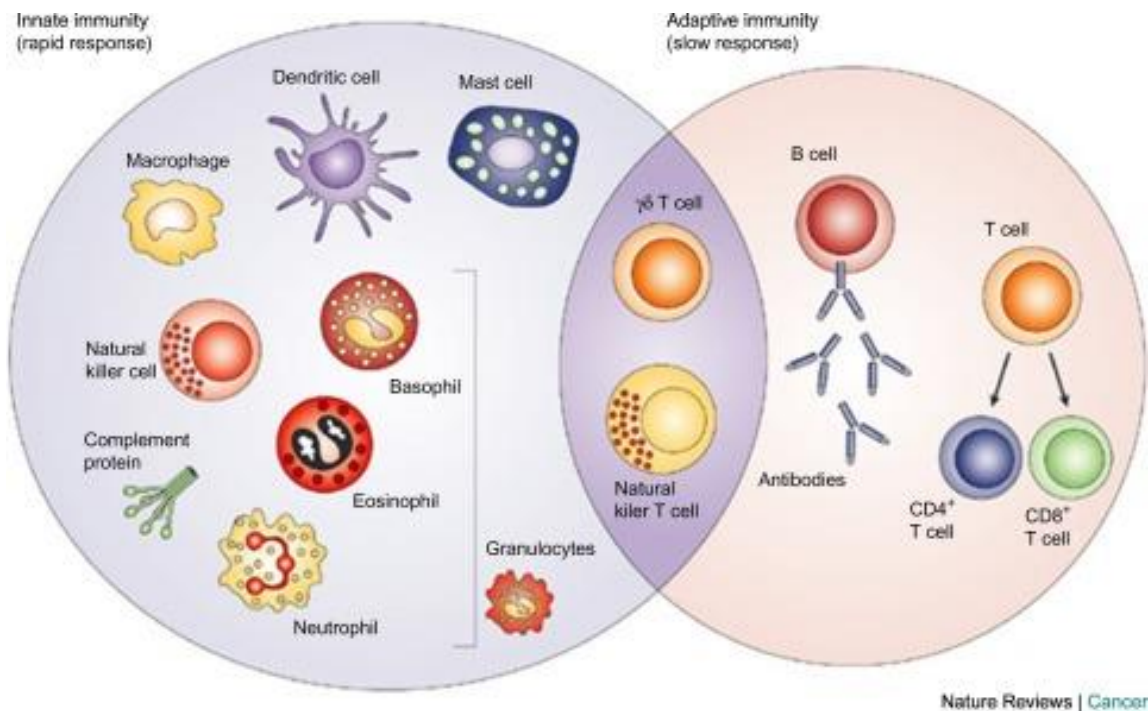


Abbildung 1: Elemente des angeborenen und erworbenen Immunsystems (Dranoff 2004)

Zu den grundlegenden Funktionen der angeborenen Immunantwort zählt die Phagozytose, welche durch die Makrophagen (differenzierte Monozyten) und neutrophilen Granulozyten realisiert wird. Makrophagen rekrutieren durch Sekretion von proinflammatorischen Mediatoren wie Interleukinen (IL-1, IL-6) weitere Abwehrzellen und triggern die Produktion von Akute-Phase-Proteinen in der Leber. Diese können, wie auch die Mediatoren des Komplementsystems, Pathogene opsonieren, direkt antimikrobiell wirken und weitere Abwehrzellen aktivieren. Die natürlichen Killerzellen eliminieren infizierte körpereigene Zellen oder intrazelluläre Erreger. Dendritische Zellen, welche sich aus Monozyten entwickeln, erkennen Antigene über Toll-like-Rezeptoren und können die Antigene den B- und T-Zellen präsentieren. Daher spielen sie eine wichtige Rolle in der Vernetzung von angeborenen und erworbener Immunantwort (Medina 2016; Murphy et al. 2018).

2.3.2. B-Zellen und Immunglobuline

B-Zellen entstehen im Knochenmark und entwickeln sich in vielen Differenzierungsschritten zu den reifen B-Zellen, welche im Blut und den lymphatischen Organen zirkulieren. Jede B-Zelle exprimiert in der Regel einen einzigartigen Antikörper. Diese Antikörper oder Immunglobuline bestehen stets

aus schweren und leichten Ketten und besitzen einen konstanten und einen variablen Bereich. Im Letztgenannten befindet sich die Antigenbindungsstelle, welche die Spezifität der Immunglobuline ausmacht. Die enorme Vielfalt von circa 10^{11} Antikörpern entsteht durch genetische Rekombination und Affinitätsreifung. Der konstante Bereich legt fest, welche Immunglobulin-Klasse vorliegt. Es gibt 5 Möglichkeiten:

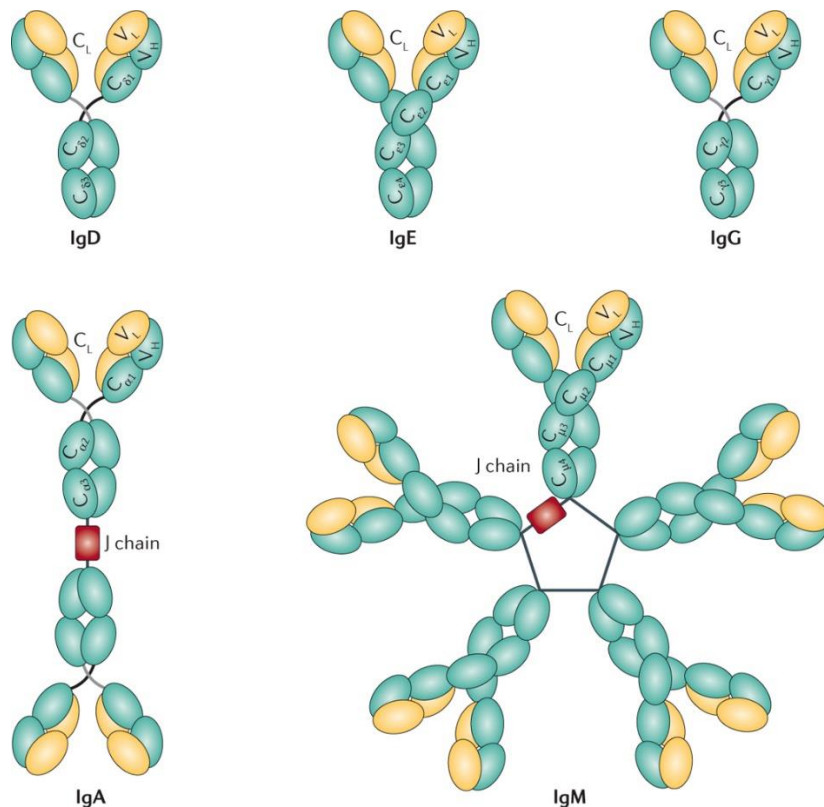


Abbildung 2: Antikörper (João H. Duarte 2016)

- (1) IgM ist ein Rezeptor der naiven B-Zellen und tritt somit als erstes im Verlauf einer Immunreaktion auf. Durch alternatives Splicing entfällt der transmembranöse Anteil und IgM wird als Penta- oder Hexamer sezerniert.
- (2) IgD ist ebenfalls membranständig und wird auf den meisten reifen naiven B-Zellen exprimiert.
- (3) IgG stellt mit 75 Prozent den höchsten Anteil im Serum dar, ist das einzige plazzentagängige Immunglobulin und spielt eine entscheidende Rolle in der Abwehr von Viren und Bakterien.
- (4) IgA kommt in vielen Körperflüssigkeiten und Sekreten vor und ist für die Schleimhautbarriere von elementarer Bedeutung.
- (5) IgE spielt über die Mastzellaktivierung und die Aktivierung basophiler Granulozyten eine wichtige Rolle in der Parasitenabwehr

und bei der Genese allergischer Erkrankungen. Die einzelnen Antikörper-Klassen eignen sich unterschiedlich gut für die verschiedenen Aufgabenbereiche bestehend aus Neutralisierung, Opsonierung, Komplementaktivierung und antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität. Daher sind Klassenwechsel, initiiert durch Zytokine und T-Zellen, im Verlauf notwendig, um eine effektive Immunantwort zu generieren (Fleischer 2011; Chaplin 2010; Parkin and Cohen 2001; Murphy et al. 2018).

2.3.3. T-Zell-Funktion

T-Zellen entstammen dem Knochenmark und reifen im Thymus zu naiven T-Zellen heran. Die Vielfalt der T-Zell-Rezeptoren entsteht, wie auch die Immunglobuline, durch somatische Rekombination. Allerdings können die T-Zellen die Spezifität ihrer Rezeptoren im Gegensatz zu den Immunglobulinen nicht mehr verändern. Nach vollendeter Ausreifung im Thymus zirkulieren die T-Zellen zwischen Blut und den sekundär lymphatischen Organen.

Dort werden ihnen Antigene via Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC)-Rezeptoren präsentiert.

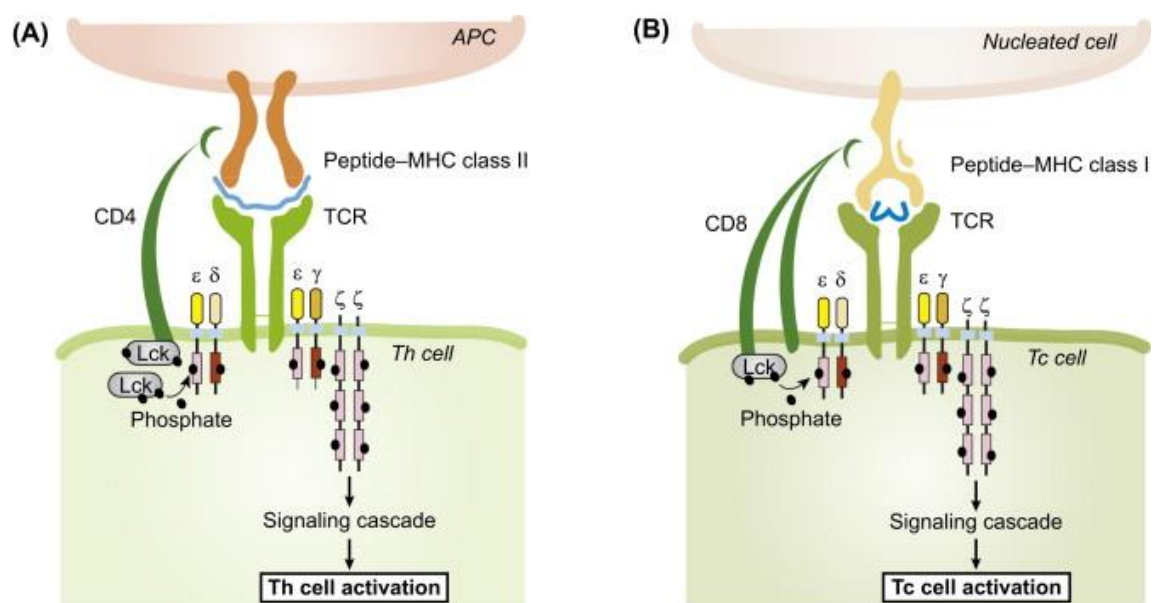


Abbildung 3: T-Zell Aktivierung (Mak, Saunders, and Jett 2014)

(A) Interaktion von MHC-II und T-Helferzellen (Th)

(B) Interaktion von MHC-I und zytotoxischer T-Zelle (Tc)

MHC-I Moleküle werden auf nahezu allen kernhaltigen Zellen des Körpers exprimiert. Sie präsentieren intrazellulär prozessierte Peptide an der

Zelloberfläche. Deuten diese beispielsweise auf eine Entartung oder Virusinfektion hin, werden diese Antigene von den zytotoxischen T-Zellen erkannt. Es kommt zu einer Bindung des MHC-I / Antigen-Komplex mit dem passenden T-Zell-Rezeptor und CD8 der T-Zelle. Die antigentragende Zelle wird entweder durch Exozytose von Granula, welche Perforin und Granzyme enthalten, oder durch Induktion der Apoptose via Fas-Liganden zerstört. Die CD8+ zytotoxische T-Zelle ist daher entscheidend in der Abwehr von virusinfizierten Zellen, intrazellulären Erregern und Tumorzellen.

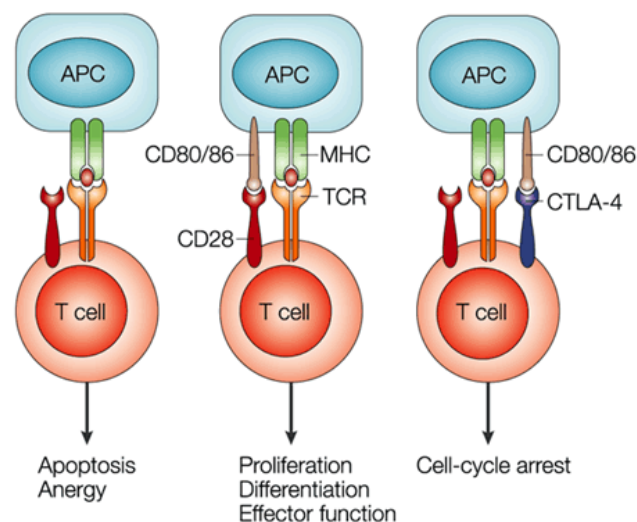
Über MHC-II Moleküle präsentieren APCs fremde Antigene. Diese werden von den T-Helferzellen erkannt. Es kommt zu einer Bindung des MHC-II / Antigen-Komplex mit dem T-Zell-Rezeptor und CD4. Die Hauptfunktion der T-Helferzellen ist die Zytokinproduktion. Darüber bewirken sie die Antikörperproduktion durch B-Zellen, deren Klassenwechsel und aktivieren Makrophagen. Naive T-Helferzellen produzieren überwiegend IL-2. Die Subgruppe T-Helferzelle 1 produziert vorwiegend INF- γ , welches unter anderem Makrophagen aktiviert und darüber an der Abwehr intrazellulärer Erreger beteiligt ist. Die Subgruppe T-Helferzelle 2 produziert überwiegend IL-4, welches unter anderem den Klassenwechsel zu IgE fördert und daher in der Parasitenabwehr mitwirkt. Die regulatorischen T-Zellen sind durch Sekretion von IL-17 in der Lage, die Immunantwort zu inhibieren.

Neben den zytoplasmatischen Domänen von CD4 und CD8 spielt der CD3-Komplex, welcher direkt mit dem T-Zell-Rezeptor assoziiert ist, eine entscheidende Funktion in der intrazellulären Signalweiterleitung.

Um die T-Zellen effizient zu aktivieren, sind neben der Einschaltung von T-Zell-Rezeptor und CD4 bzw. CD8 costimulatorische Signale notwendig: Interagiert CD28 der T-Zelle mit CD80 und CD86 der APC, wird die Zytokinproduktion maximal aktiviert. Fehlt dieses costimulatorische Signal oder überwiegen inhibitorische Signale, kommt es zur Anergie oder Apoptose der T-Zelle (Fleischer 2011; Fife and Bluestone 2008; Chaplin 2010; Parkin and Cohen 2001; Murphy et al. 2018).

2.4. Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4 (CTLA-4)

CTLA-4 ist ein bedeutender Checkpoint-Inhibitor (Alatrash, Daver, and Mittendorf 2016): Erfolgt eine T-Zell-Aktivierung durch APCs via T-Zell-Rezeptor und costimulatorische Signale, wird CTLA-4 von intrazellulären Kompartimenten an die Zelloberfläche verlagert. Dort kann es CD80 und CD86 auf APCs binden und initiiert in den T-Zellen eine Hemmung des Zellzyklus, eine verminderte Transkription von NF κ B, NF-AT und AP-1 sowie eine verminderte Zytokin-Produktion. Diese Mechanismen führen zu einer Inhibition der T-Zell-Funktion und im Weiteren zu einem veränderten Immunstatus. Die Affinität zu CD80 und CD86 ist dabei 20fach höher als die des CD28, sodass eine Dominanz des inhibitorischen gegenüber dem aktivierenden Signal vorliegt (Krummel and Allison 1995; Linsley et al. 1996; Teft, Kirchhof, and Madrenas 2006; Valk, Rudd, and Schneider 2008; Salama and Hodi 2011; Chikuma 2017; Rudd, Taylor, and Schneider 2009).



Nature Reviews | Immunology

Abbildung 4: Interaktionsmöglichkeiten zwischen T-Zelle und APC (Alegre, Frauwirth, and Thompson 2001)

- Links: Bindung von MHC-Antigen-Komplex mit dem TCR
- Mitte: zusätzlich costimulatorisches Signal durch CD28
- Rechts: zusätzlich inhibitorisches Signal durch CTLA-4

In Hinblick auf die umfangreichen Funktionen des CTLA-4 bedarf es allerdings noch einer differenzierteren Betrachtung.

Das CTLA-4 Gen ist auf dem langen Arm des zweiten Chromosoms lokalisiert und besteht aus vier Exons, wobei die ersten beiden Exons für die extrazelluläre, Exon 3 für die transmembranöse und Exon 4 für die intrazelluläre Domäne kodieren. Es werden zwei Isoformen des CTLA-4 unterschieden: Sind alle vier Exons enthalten spricht man vom „full length“-CTLA-4 (flCTLA-4); fehlt hingegen die transmembranöse Domäne, spricht man vom „soluble“ CTLA-4 (sCTLA-4) (Teft, Kirchhof, and Madrenas 2006; Mossallam and Samra 2013; Zhang et al. 2016; Chikuma 2017). Durch das flCTLA-4 werden oben beschriebene Vorgänge, also die Inhibition der T-Zell-Antwort, umgesetzt. Das sCTLA-4, welches sich konstitutiv auf regulatorischen T-Zellen befindet, verstärkt jedoch die Immunantwort durch T-Zellen und sorgt damit für die notwendige Balance zwischen Inhibition und Aktivierung (Magistrelli et al. 1999; Purohit et al. 2005). Die dargestellten Funktionsweisen des CTLA-4 werden in den letzten Jahrzehnten viel diskutiert. Die exakten Signalwege sind jedoch noch nicht genau verstanden und werden auch Thema zukünftiger Forschung sein (Walker and Sansom 2015).

2.5. Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs)

Die DNA (Desoxyribonukleinsäure) ist Träger der Erbinformation. Sie besteht aus einer Kette vieler Nukleotide. Als Nukleotide bezeichnet man die Verbindung aus einer Base, einer Pentose und dem Phosphatrest. In der DNA kommen folgende Basen vor: Adenin (A), Guanin (G), Cytosin (C) und Thymin (T), wobei im DNA-Doppelstrang jeweils Adenin und Thymin sowie Guanin und Cytosin ein komplementäres Basenpaar bilden. Mit dem Humangenomprojekt (1990-2003) gelang es, die gesamte DNA, bestehend aus circa 3 Milliarden Basenpaaren, zu kartieren. Die genetische Information ist demnach auf etwa 30 000 bis 40 000 Genen gespeichert. (Hood and Galas 2003; Lander et al. 2001; International Human Genome Sequencing 2004). Dabei gibt es interindividuell eine große genetische Vielfalt.

Die häufigste Variation entsteht durch sogenannte Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs), definiert als eine Position, auf der zwei alternative Basen mit einer Häufigkeit von über 1 Prozent in der Population vorkommen (Landegren, Nilsson, and Kwok 1998; Wang et al. 1998; Ahmadian et al. 2000; Brookes 1999).

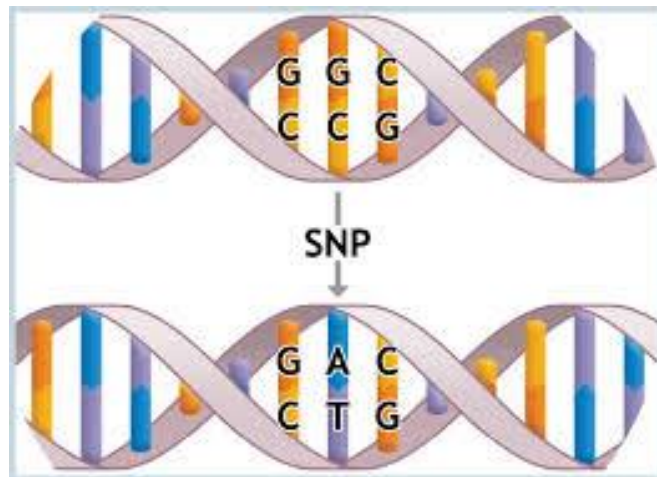


Abbildung 5: Einzelnukleotid-Polymorphismus (immunology 2014)

Ein 2001 in Nature publizierter Artikel berichtet, dass circa alle 1,9 Kilobasen ein SNP vorliegt. Dies entspricht etwa 1,42 Millionen SNPs im gesamten Genom (Sachidanandam et al. 2001). Inzwischen sind über 2 Millionen SNPs bekannt und man schätzt, dass insgesamt circa 11 Millionen SNPs existieren, welche mit einer Allelfrequenz von $\geq 1\%$ vorkommen. Bei der Allelfrequenz von 1% läge alle 290 Basen ein Basenaustausch vor. Evolutionär ältere SNPs haben eine niedrigeren Allelfrequenz und sind entsprechend seltener (Sachidanandam et al. 2001; Cichon 2002). SNPs kommen sowohl in kodierenden als auch in nicht-kodierenden Bereichen vor. SNPs in kodierenden oder regulatorischen Bereichen, welche sehr wahrscheinlich Krankheitsentstehung oder -verlauf über veränderte Aminosäuresequenzen und dadurch veränderte Proteinstruktur oder Expressionslevel beeinflussen, besitzen eine niedrigere Allelfrequenz als stumme Mutationen. Doch auch diese haben als genetische Marker eine wichtige Bedeutung (Cargill et al. 1999; Cichon 2002; Collins, Brooks, and Chakravarti 1998; Landegren, Nilsson, and Kwok 1998).

3. Ziele der Arbeit

Die Intention der Arbeit besteht darin, den Einfluss von CTLA-4 Polymorphismen auf relevante Endpunkte nach allogener hämatopoetischen Stammzelltransplantation (HSZT) zu ermitteln. Zeigt sich ein Zusammenhang zwischen Spender CTLA-4 Polymorphismen und Endpunkten, wie Überleben, transplantations-assoziiierter Letalität oder Rezidivrate, könnte diese Information der optimalen Spenderauswahl dienen und damit das Ergebnis der Transplantation verbessern. Es werden Polymorphismen des CTLA-4 untersucht, welche im Fokus der aktuellen Forschung stehen.


Dafür werden kryokonservierte Proben von Leukämie-Patienten und deren Spendern, welche an der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin des Universitätsklinikums Jena eine allogene HSZT erhielten, retrospektiv analysiert. Die Ergebnisse sollen in Kenntnis der Effekte des CTLA-4 auf die Immunmodulation eingeordnet und erläutert werden. Decken sich unsere Analysen mit dem Verständnis der Funktionsweise des CTLA-4 und bereits publizierten Erkenntnisse, sollen die Forschungsergebnisse als korrekt vermutet werden und eine Basis für weiterer Forschung sein.

4. Publizierte Originalarbeiten

- 4.1. CTLA-4 polymorphisms: Influence on transplant-related mortality and survival in children undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation**



CTLA-4 polymorphisms: influence on transplant-related mortality and survival in children undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation

Judith Hammrich¹ · Susan Wittig¹ · Thomas Ernst² · Bernd Gruhn¹ 

Received: 18 November 2017 / Accepted: 6 January 2018 / Published online: 15 January 2018
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2018

Abstract

Purpose Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is a curative approach for a variety of hematological diseases; however, it is still associated with substantial morbidity and mortality. Transplant-related mortality (TRM) after HSCT depends mainly on the toxicity of the conditioning regimen, infections, and graft-versus-host disease. The purpose of this study was to identify the association between CTLA-4 single nucleotide polymorphisms and TRM in children undergoing allogeneic HSCT.

Methods 153 donors and 153 children with acute lymphoblastic leukemia, acute myeloid leukemia or juvenile myelomonocytic leukemia who had undergone allogeneic HSCT were genotyped of CTLA-4 gene for rs3087243 (CT60G>A), rs231775 (+49 A>G) and rs4553808 using TaqMan real-time polymerase chain reaction.

Results We observed a significant association between the donor's CTLA-4 genotype of rs3087243 and TRM in children undergoing allogeneic HSCT. Genotype AG was found in 78 donors (51%), GG in 44 donors (29%) and 31 donors (20%) were homozygous for AA. 30 patients died as a result of transplant-related causes. Interestingly, we observed a significantly reduced TRM in children who were transplanted from a donor with the CTLA-4 genotype GG in comparison to genotype AG or AA (9 versus 19 versus 36%, $P=0.013$). In addition, we found significant differences of event-free survival (EFS) depending on the donor's genotype. The EFS was 64, 46 or 32% if the patient was transplanted from a donor with CTLA-4 genotype GG, AG or AA, respectively ($P=0.043$). In multivariate analysis, CTLA-4 genotype of rs3087243 was an independent risk factor for TRM ($P=0.011$) and EFS ($P=0.035$).

Conclusion This study provides first evidence that the CTLA-4 polymorphisms are significant risk factors for TRM and survival in children undergoing allogeneic HSCT and should be evaluated in further trials.

Keywords CTLA-4 · Single nucleotide polymorphism · Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation · Children · Transplant-related mortality

Introduction

Cancer is the second leading cause of death after accidents in children aged 1–14 years. The most common type of cancer in children is leukemia, which accounts for about one-third of all cases. Of these, acute lymphoblastic leukemia

(ALL) is prevalent with about 75% followed by acute myeloid leukemia (AML) and juvenile myelomonocytic leukemia (JMML). However, thanks to significant improvement in treatment in recent decades, the 10-year survival of ALL has increased to over 90% (Pui et al. 2017). For most patients, chemotherapy is a sufficient treatment, although certain patients require a more aggressive treatment. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) has developed into an effective curative treatment for children with leukemia and poor risk features. The success of the allogeneic HSCT depends on several factors, of which the graft-versus-leukemia effect is very important for outcome (Hoffmann et al. 2015; Qin et al. 2016; Seggewiss and Einsele 2010).

✉ Bernd Gruhn
Bernd.Gruhn@med.uni-jena.de

¹ Department of Pediatrics, Jena University Hospital, Am Klinikum 1, 07747 Jena, Germany

² Department of Internal Medicine II, Jena University Hospital, Jena, Germany

Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) is a crucial inhibitory immune checkpoint molecule (Alatrash et al. 2016). The CTLA-4 gene is located on chromosome 2q33 and consists of 4 exons. Exons 1 and 2 code for the extracellular domain, exon 3 encodes the transmembrane domain and exon 4 encodes the cytoplasmic part. In humans, there are two main isoforms: the isoform full length CTLA-4 (fCTLA-4) that contains 4 exons and the isoform soluble CTLA-4 (sCTLA-4) which is generated by alternative splicing and lacks the transmembrane part (Mossallam and Samra 2013; Teft et al. 2006; Zhang et al. 2016). In resting T cells, fCTLA-4 is mainly localized in intracellular compartments (Linsley et al. 1996; Salama and Hodi 2011). The translocation to the cell surface is provoked by T cell receptor contact combined with further costimulatory signals (Egen and Allison 2002; Linsley et al. 1996; Salama and Hodi 2011). Subsequently, CTLA-4 binds CD80 and CD86 on antigen-presenting cells with an affinity 20 times higher than the competing CD28 indicating that the inhibitory signal predominates. The downregulation of the T cell-mediated immune response is particularly implemented by the inhibition of the cell cycle, decrease of transcription factors NFκB, NF-AT and AP-1 and reduced production of cytokines such as IL-2 (Karabon et al. 2015; Krummel and Allison 1995; Linsley et al. 1992; Sansom and Walker 2006; Teft et al. 2006; Valk et al. 2008). These mechanisms lead to modulation of the immune response, influence on T cell homeostasis, differentiation, and affection of central and peripheral tolerance (Krummel and Allison 1995; Laurent et al. 2010; Olsson et al. 1999; Sellami et al. 2011; Valk et al. 2008; Zhang et al. 2016). The significance of CTLA-4 was verified by studies with monoclonal antibodies and CTLA-4 deficient mice which developed lymphoproliferative diseases and died within 4 weeks (Fife et al. 2006; Tivol et al. 1995; Waterhouse et al. 1995). To ensure the required balance sCTLA-4, constitutively expressed by regulatory T cells, amplifies the immune response (Magistrelli et al. 1999; Purohit et al. 2005). Genetic polymorphisms within the CTLA-4 gene affect the ratio of the two isoforms and, therefore, the extent of the T cell activity (Karabon et al. 2015; Mossallam and Samra 2013; Perez-Garcia et al. 2007; Ueda et al. 2003). The single nucleotide polymorphism (SNP) CT60 has gained increasing attention in the latest research, because a large number of studies described CT60 as a possible predictor of transplantation outcome (Bosch-Vizcaya et al. 2012; Jagasia et al. 2012; Karabon et al. 2015; Mossallam and Samra 2013; Orrù et al. 2012; Qin et al. 2016; Sellami et al. 2011; Metaxas et al. 2012). Our aim was to examine the association between certain CTLA-4 polymorphisms and the outcome after allogeneic HSCT in children.

Patients and methods

Patients

We retrospectively analyzed 153 patients and their donors transplanted at the Department of Pediatrics, Jena University Hospital, Jena, Germany. We included all children with ALL, AML, and JMML who received allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Further characteristics of the patients are presented in Table 1.

Genotyping of CTLA-4 polymorphism

DNA was isolated from blood, cord blood, or bone marrow aspirates using High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's instructions. The concentration of the purified

Table 1 Characteristics of patients and donors (*n* = 153)

| Characteristics | Total, no. (%) |
|---------------------------------|----------------|
| Median age of the patients (y) | 11 |
| Sex of the patients | |
| Male | 88 (57.5) |
| Female | 65 (42.5) |
| Disease | |
| ALL | 90 (58.8) |
| AML | 58 (38.0) |
| JMML | 5 (3.2) |
| Remission (complete) | |
| First | 49 (32.0) |
| Second | 40 (26.2) |
| Third | 15 (9.8) |
| Not in remission | 49 (32.0) |
| Conditioning regimen (based on) | |
| Total body irradiation | 79 (51.6) |
| Busulfan | 68 (44.4) |
| GVHD prophylaxis | |
| Cyclosporine A/methotrexate | 98 (64.1) |
| Cyclosporine A | 38 (24.8) |
| None | 12 (7.8) |
| Others | 5 (3.3) |
| Donor type | |
| HLA-matched unrelated | 71 (46.6) |
| HLA-mismatched unrelated | 20 (13.1) |
| HLA-identical related | 47 (30.7) |
| HLA-haploidentical related | 15 (9.8) |
| Cell type | |
| Bone marrow | 105 (68.6) |
| Peripheral blood stem cells | 46 (30.1) |
| Cord blood | 2 (1.3) |

template DNA was quantified at 260 and 280 nm using the BioPhotometer plus (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Germany). We generated a mix containing 1 μ L (10 ng/ μ L) DNA, 10 μ L Genotyping Mastermix, 9.5 μ L sterile aqua and 0.5 μ L primer-probe mix (TaqMan Genotyping Assays by Applied Biosystems). The samples and minimum five negative controls were transferred into 96-well optical Reaction Plates with Barcode by pipettes. Using 7900HT Fast Real-Time PCR System by Applied Biosystems, the DNA underwent an absolute quantification process with two diverse detectors. Therefore, the samples were heated 10 min to 95 °C for activation, followed by 40 cycles each of 15 s at 92 °C for denaturation and closing with 60 s at 60 °C for annealing and extension. Afterwards, the particular SNP was analyzed during an allelic discrimination post-read run. Overall we explored three different SNPs: rs3087243 (C_3296043_10), rs231775 (C_2415786_20) and rs4553808 (C_27916481_10).

Statistical analysis

Our primary aim was to examine a potential correlation between CTLA-4 polymorphism and event-free survival (EFS), overall survival (OS), transplant-related mortality (TRM), and relapse rate (RR). EFS and OS were calculated by the Kaplan–Meier method. Differences were compared using the log-rank test. OS was defined as the time between stem cell transplantation and death of any cause. EFS describes the time between stem cell transplantation and relapse, secondary malignancy, or death. RR and TRM were analyzed using survival calculation with competing risks. Differences between the curves were evaluated with the Gray test (Gray 1988). RR describes the cumulative incidence of relapse. TRM was defined as death without a former sign of progression or relapse. All calculations were made using IBM SPSS Statistics 23 and R Foundation for Statistical Computing 3.2.5. A *P* value of < 0.05 was considered statistically significant. Multivariate analyses were performed to identify possible confounding variables such as disease risk, gender match, and age at time of diagnosis. Disease risk was considered low if the patients were transplanted in complete first or second remission and high if the transplantation was performed in more than second remission or in relapse.

Results

Frequency of polymorphisms

We analyzed 153 pairs of patients and their donors. The heterozygote genotype AG of CTLA-4 SNP rs3087243 was found in 78 donors (51.0%), GG in 44 donors (28.8%) and AA in 31 donors (20.3%). The distribution of CTLA-4 SNPs

did not differ from results of a publication with 536 donors (Perez-Garcia et al. 2007).

Event-free survival

Three years post-transplantation, 74 of 153 patients (48.4%) survived without a relapse. Interestingly, we found a significant association between the donor's genotype and the event-free survival (EFS). The EFS was 63.6, 46.2 or 32.3% if the patient was transplanted from a donor with CTLA-4 genotype GG, AG, or AA, respectively ($P=0.043$) (Fig. 1). This difference was also detected when analyzing only patients who were in first or second remission at time of transplantation ($P=0.020$). The EFS was also better for patients transplanted from donors with CTLA-4 genotype GG, when analyzing only patients with ALL ($P=0.038$).

Transplant-related mortality

Seventy patients died within 3 years post-transplantation, 30 deaths of which were transplant related. Ten patients (33.3%) died of infection in which seven patients (23.3%) suffered from viral infection and three patients (10.0%) from invasive fungal disease. Three of the ten patients were additionally diagnosed with graft-versus-host disease (GVHD). Further five patients (16.7%) died of acute GVHD, two patients (6.7%) of chronic GVHD and three patients (10.0%) of hepatic sinusoidal obstruction syndrome. Further ten patients (33.3%) died of multi-organ failure with different leading focuses. In four cases (13.3%), the patient's

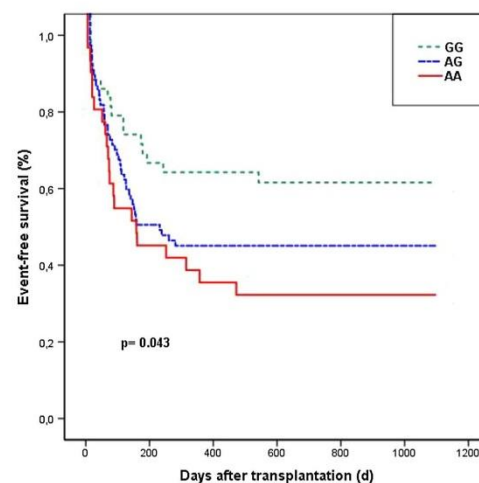


Fig. 1 Event-free survival according to donor's SNP rs3087243 status

condition was primarily impaired by pulmonary failure, in three cases (10.0%) by sepsis without an identified pathogen, in one case (3.3%) by cardiomyopathy, in one case (3.3%) by capillary leak syndrome and in one case (3.3%) by intracranial hemorrhage. We observed a significantly reduced TRM in children who were transplanted from a donor with the CTLA-4 genotype GG in comparison to genotype AG or AA (9.1 versus 19.2 versus 35.5%, $P=0.013$) (Fig. 2).

Multivariate analysis

Multivariate analysis was used to test whether the association between donor's CTLA-4 polymorphism and TRM and EFS was affected by other factors. The results are presented in Table 2 and indicate that the rs3087243 CTLA-4 SNP is an independent risk factor for EFS and TRM.

The donor's CTLA-4 SNP CT60 was not significantly associated with either acute GVHD ($P=0.477$) or chronic GVHD ($P=0.55$). There was no significant correlation between CT60 SNP and RR ($P=0.748$). The recipient's genotype had no significant effect on the surveyed clinical outcomes. Furthermore, no significant correlation was

observed between the CTLA-4 polymorphisms rs231775 or rs4553808 and acute GVHD, chronic GVHD, OS or TRM.

Discussion

In this paper, we would like to point out that the donor's CTLA-4 polymorphism CT60 has a significant influence on TRM ($P=0.011$) and EFS ($P=0.035$). CT60 is located in the 3' untranslated region of the CTLA-4 gene (Purohit et al. 2005). Many studies have evaluated the correlation between the exchange of guanine and adenine in CT60 and the outcome after allogeneic HSCT: Perez Garcia et al. (2007) postulated in their study that donor's CT60G>A [AA] increased the risk of acute GVHD II-IV but with a reduced relapse rate and better 5-year overall survival. Similarly, Qin et al. (2016) found an association between CT60G>A [AA] or [AG] and the higher risk of developing an extensive chronic GVHD compared to CT60G>A [GG] in patients diagnosed with ALL. However, results of other studies conflict with the conclusions above. Karabon et al. (2015) described a lower frequency, that was not statistically significant, of acute GVHD if the donor had the genotype CT60G>A [AA] compared to CT60G>A [AG] or [GG]. Correspondingly, the study of Xiao et al. (2012) indicated that patients receiving hematopoietic stem cells from donors with CT60G>A [AA] had a lower risk of developing acute GVHD II-IV. This incoherency may be explained by different types of transplantation, different conditioning protocols, and GVHD prophylaxis or different ethnic constellations. For example, Karabon et al. (2015) and Xiao et al. (2012) included cases with both related and unrelated donors. Whereas Perez Garcia et al. (2007) and Qin et al. (2016) used more homogeneous groups with either HLA-identical siblings or HLA-haploidentical donors. In addition, our patients are children while all other studies analyzed adults (median age 11 years versus 23–34 years). Further pediatric studies are needed to evaluate the significance of this difference.

In our study, we found no statistically significant correlation between CT60G>A polymorphisms and acute or chronic GVHD. The lack of association was also reported by Mossallam et al. (2013) and Murase et al. (2011). However, we postulate that allele A is associated with a higher risk of TRM referring to an explanatory model, which is

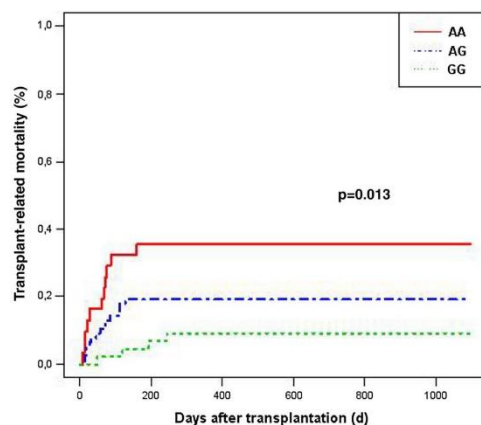


Fig. 2 Transplant-related mortality according to donor's SNP rs3087243 status

Table 2 Multivariate analysis. Event-free survival (EFS) and transplant-related mortality (TRM)

| Variable | EFS | | TRM | |
|--------------------------|---------------------|--------|---------------------|-------|
| | HR (95% CI) | P | HR (97.5% CI) | P |
| Donor CTLA-4 (rs3087243) | 0.704 (0.509–0.975) | 0.035 | 0.507 (0.301–0.853) | 0.011 |
| Disease risk | 0.413 (0.259–0.658) | <0.001 | 3.029 (1.407–6.519) | 0.005 |
| Gender match | 1.398 (0.870–2.248) | 0.166 | 1.570 (0.744–3.312) | 0.240 |
| Age at time of diagnosis | 0.937 (0.589–1.491) | 0.782 | 2.041 (0.959–4.345) | 0.064 |

supported by the assumptions of Perez et al. (2007) and Qin et al. (2016): CTLA-4 exists in two isoforms. The isoform flCTLA-4 inhibits the T-cell activation by negative signaling and leads to T-cell anergy by B7 sequestration (Schwartz 2003; Krummel and Allison 1995; Jagasia et al. 2012). The isoform sCTLA-4 antagonizes this process to keep the immune response in balance. The A allele leads to a higher expression of sCTLA-4 and consequently the T cells stay more active (Perez-Garcia et al. 2007; Qin et al. 2016; Ueda et al. 2003). This explains the higher incidence of GVHD if patients received stem cells from donors with CT60G>A [AA]. However, this also means that the graft-versus-leukemia effect is intensified. This consideration matches with the fact that in other CTLA-4 polymorphisms, a correlation between A allele and decreased risk of relapse was shown because the more active T cells destroy residual leukemic cells (Jagasia et al. 2012).

We found a significant correlation between the children receiving CT60 [GG] T-cells from their donor and a better EFS (63.6 versus 46.2 and 32.3%). For an explanation, several studies focused only on one complication, the GVHD. In our research, the transplant-related mortality was predominated by infections (10 cases) and multi-organ failure (10 cases), whereas acute and chronic GVHD caused death in seven cases. We assume that CT60 [GG] optimizes the activity of the T-cells, so that the balance between suppression of the immune response and an effective defense is well adjusted. Precisely, patients are protected from an excessive T-cell activity that can cause multi-organ failure, but the level of activity stays high enough to fulfill an accurate defense of infections. This hypothesis matches with the results of Bosch et al. (2012) who found a non-significant trend of increased TRM, when the donor had genotype CT60 [AA]. Knowing the level of T-cell activity, determined by CTLA-4 polymorphisms, could improve the risk assessment and promote the selection of the most suitable donor and medication.

In conclusion, this study provides first evidence that the CTLA-4 polymorphisms could be significant risk factors for TRM and survival in children undergoing allogeneic HSCT. Thus, further pediatric multicenter studies with a larger number of patients are necessary to properly evaluate our findings.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors have no potential conflicts of interest to declare.

Ethical standard All procedures were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards. The study has been approved by the Jena University Hospital Ethics Committee (5154-05/17). Informed consent

was obtained from all individual participants or the responsible persons included in the study.

References

- Alatrash G, Daver N, Mittendorf EA (2016) Targeting immune checkpoints in hematologic malignancies. *Pharmacol Rev* 68:1014–1025
- Bosch-Vizcaya A, Pérez-García A, Brunet S, Solano C, Buño I, Guillem V, Martínez-Laperche C, Sanz G, Barrenetxea C, Martínez C, Tuset E, Llovetas N, Coll R, Guardia R, González Y, Roncero JM, Bustins A, Gardella S, Fernández C, Buch J, Gallardo D (2012) Donor CTLA-4 genotype influences clinical outcome after T cell-depleted allogeneic hematopoietic stem cell transplantation from HLA-identical sibling donors. *Biol Blood Marrow Transpl* 18:100–105
- Egen JG, Allison JP (2002) Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4 accumulation in the immunological synapse is regulated by TCR signal strength. *Immunity* 16:23–35
- Fife BT, Griffin MD, Abbas AK, Locksley RM, Bluestone JA (2006) Inhibition of T cell activation and autoimmune diabetes using a B cell surface-linked CTLA-4 agonist. *J Clin Invest* 116:2252–2261
- Gray RJ (1988) A class of K-sample tests for comparing the cumulative incidence of a competing risk. *Ann Statist* 16:1141–1154
- Hoffmann GF, Lentze MJ, Spranger J, Zepp F (2015) *Pädiatrie: Grundlagen und Praxis*. Springer, New York
- Jagasia M, Clark WB, Brown-Gentry KD, Crawford DC, Fan KH, Chen H, Kassim A, Greer JP, Engelhardt BG, Savani BN (2012) Genetic variation in donor CTLA-4 regulatory region is a strong predictor of outcome after allogeneic hematopoietic cell transplantation for hematologic malignancies. *Biol Blood Marrow Transpl* 18:1069–1075
- Karabon L, Markiewicz M, Partyka A, Pawlak-Adamska E, Tomkiewicz A, Dzierzak-Mietla M, Kyrz-Krzemien S, Frydecka I (2015) A CT60G>A polymorphism in the CTLA-4 gene of the recipient may confer susceptibility to acute graft versus host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Immunogenetics* 67: 295–304
- Krummel MF, Allison JP (1995) CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J Exp Med* 182: 459–465
- Laurent S, Carrega P, Saverino D, Piccoli P, Camoriano M, Morabito A, Dozin B, Fontana V, Simone R, Mortara L, Mingari MC, Ferlazzo G, Pistillo MP (2010) CTLA-4 is expressed by human monocyte-derived dendritic cells and regulates their functions. *Hum Immunol* 71: 934–941
- Linsley PS, Wallace PM, Johnson J, Gibson MG, Greene JL, Ledbetter JA, Singh C, Tepper MA (1992) Immunosuppression in vivo by a soluble form of the CTLA-4 T cell activation molecule. *Science* 257: 792–795
- Linsley PS, Bradshaw J, Greene JA, Peach R, Bennett KL, RS Mittler (1996) Intracellular trafficking of CTLA-4 and focal localization towards sites of TCR engagement. *Immunity* 4: 535–543
- Magistrelli G, Jeannin P, Herbault N, Coignac ABde, Gauchat J-F, Bonnefoy J-Y, Delneste Y (1999) A soluble form of CTLA-4 generated by alternative splicing is expressed by nonstimulated human T cells. *Eur J Immunol*, 29: 3596–3602
- Metaxas Y, Bertz H, Spyridonidis A, Spyropoulou-Vlachou M, Porzelius C, Finke J (2012) CT60 single-nucleotide polymorphism as a surrogate marker for donor lymphocyte infusion outcome after allogeneic cell transplantation for acute leukemia. *Bone Marrow Transpl* 47: 411–415

4.2. CTLA-4 polymorphism rs231775: Influence on relapse and survival after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in childhood

CTLA-4 polymorphism rs231775: Influence on relapse and survival after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in childhood

Judith Hammrich¹ | Susan Wittig¹ | Thomas Ernst² | Bernd Gruhn¹

¹Department of Pediatrics, Jena University Hospital, Jena, Germany

²Department of Internal Medicine II, Jena University Hospital, Jena, Germany

Correspondence

Bernd Gruhn, Head of the Unit for Hematology/Oncology and Stem Cell Transplantation, Department of Pediatrics, Jena University Hospital, Jena, Germany.
Email: bernd.gruhn@med.uni-jena.de

Funding information

Jose Carreras Leukämie Stiftung, Grant/Award Number: Jose Carreras DGHO Promotionsstipendium

Abstract

Objective: Relapse following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is still linked to a poor prognosis. Mainly, donor's T-cells mediate the graft-versus-leukemia effect. Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) is an inhibitory molecule which down-regulates T-cell activation. Single nucleotide polymorphism (SNP) in CTLA-4 may have an effect on immune response.

Methods: Eighty-eight children with acute leukemia and their donors were genotyped of CTLA-4 gene for rs231775. We searched for an association of CTLA-4 SNP with relapse and survival after allogeneic HSCT.

Results: We identified a significantly reduced relapse rate in children who received a transplant from a donor with the CTLA-4 genotypes AG or GG in comparison with genotype AA of rs231775 (19% vs 40%, $P = 0.026$). In addition, we observed a significant difference in event-free survival (EFS) depending on the donor's genotype. The EFS was 70% or 46% if the patient was transplanted from a donor with CTLA-4 genotype AG/GG or AA, respectively ($P = 0.025$). In multivariate analysis, CTLA-4 genotype was an independent risk factor for relapse rate ($P = 0.028$).

Conclusion: This study suggests that CTLA-4 polymorphism rs231775 is relevant for relapse and survival after allogeneic HSCT in childhood and should be further investigated in clinical trials.

KEYWORDS

acute lymphoblastic leukemia, acute myeloid leukemia, bone marrow transplantation, pediatric hematology

1 | INTRODUCTION

In our recently published paper,¹ we were able to identify a significant association between cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) single nucleotide polymorphism (SNP) CT60 and transplant-related mortality, but no relevant impact on the relapse rate. However, knowing the functionality of CTLA-4, we still believed that there could be a significant correlation. For this reason, we further investigated our study characteristics and searched for possible factors that would explain the lack of association. We recognized

that a high portion of the patients included were not in remission at the time of transplantation. In these critically ill patients, the risk of relapse was likely offset by the transplant-related mortality. We thus started a second investigation and selected a more homogeneous group of patients who were all transplanted in first or second complete remission.

Relapses occur after transplantation if the graft-versus-leukemia effect (GVL) is too diminished to destroy all residual leukemia cells. The GVL effect means the elimination of the patient's residual leukemia cells by the T-cells of the donor. This benefit after allogeneic

hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) has been known for several decades: Horowitz et al² observed a decreased relapse rate (RR) if patients received a non-T-cell-depleted allograft concluding that they benefit from the GVL effect without having a higher risk of graft-versus-host disease (GVHD). The capability of donor T-cells to reject residual leukemia cells and consequently reduce the RR has been described by several other studies in recent decades.^{3–8}

The activation of T-cells is influenced by CTLA-4. CTLA-4 is a crucial inhibitory element of the immune cascade.⁹ It exists in two isoforms of which the full length (fl) CTLA-4 binds on CD80 and CD86 on antigen presenting cells leading to an inhibition of the cell cycle. The soluble (s) CTLA-4 is constitutively expressed on regulatory T-cells and provides for the necessary balance in the immune reaction by amplifying the defense cascade. This cooperation of activation and inhibition controls central and peripheral tolerance.^{10–15} The efficiency of CTLA-4 is affected by the different SNPs. Several publications describe the following mechanism of action: if the SNP rs231775 contains at least one G allele, the expression of CTLA-4 is decreased compared to genotype AA.^{16–18} Consequently, the more active donor T-cells^{18,19} could intensify the GVL effect. In our research, the logical conclusion would imply that patients transplanted from donors with the SNP genotype AG or GG may have a lower relapse rate and better survival.

2 | PATIENTS AND METHODS

2.1 | Patients

We retrospectively analyzed 88 patients and their donors transplanted at the Department of Pediatrics, Jena University Hospital, Jena, Germany. We included all children with acute lymphoblastic leukemia (ALL) and acute myeloid leukemia (AML) who received allogeneic HSCT in first or second complete remission at the time of transplantation. All patients who were transplanted from an unrelated donor or a HLA-haploidentical donor received serotherapy using antithymocyte globulin. Further information concerning the patients is shown in Table 1.

2.2 | Genotyping of CTLA-4 polymorphism

DNA was isolated from blood or bone marrow aspirates and quantified via photometer. Using Real-Time PCR, the DNA underwent an absolute quantification process. The particular SNP rs231775 (C_2415786_20) was analyzed via allelic discrimination. More detailed information concerning materials and methods is given in our recently published paper.¹

2.3 | Statistical analysis

Our primary aim was to examine a potential correlation between CTLA-4 polymorphism and event-free survival (EFS), overall survival (OS), and RR. EFS and OS were calculated using the Kaplan-Meier method. Differences were compared using the log-rank test. OS was

TABLE 1 Characteristics of patients and donors (n = 88)

| Characteristics | Total, No. (%) |
|---|---------------------|
| Median age of the patients (y) | 11 |
| Age range | 7 months – 23 years |
| Sex of the patients | |
| Male | 51 (58.0) |
| Female | 37 (42.0) |
| Disease | |
| Acute lymphoblastic leukemia | 58 (65.9) |
| Acute myeloid leukemia | 30 (34.1) |
| Remission (complete) | |
| First | 48 (54.5) |
| Second | 40 (45.5) |
| Conditioning regimen (based on) | |
| Total body irradiation | 45 (51.1) |
| Busulfan | 38 (43.2) |
| Treosulfan | 5 (5.7) |
| GVHD prophylaxis | |
| Cyclosporine A/methotrexate | 65 (73.8) |
| Cyclosporine A | 18 (20.5) |
| None | 2 (2.3) |
| Others | 3 (3.4) |
| Sex match (donor → recipient) | |
| m → m | 35 (39.8) |
| w → w | 19 (21.6) |
| m → w | 18 (20.4) |
| w → m | 16 (18.2) |
| Donor type | |
| HLA-matched unrelated | 38 (43.2) |
| HLA-mismatched unrelated | 10 (11.4) |
| HLA-identical related | 35 (39.8) |
| HLA-haploidentical related | 5 (5.6) |
| Stem cell source | |
| Bone marrow | 67 (76.1) |
| Peripheral blood stem cells | 21 (23.9) |
| Donors' CTLA-4 polymorphisms distribution | |
| AA | 35 (39.8) |
| AG/GG | 53 (60.2) |

GVHD, graft-versus-host disease.

defined as the time between stem cell transplantation and death from any cause. EFS describes the time between stem cell transplantation and relapse, secondary malignancy, or death. RR was analyzed using survival calculation with competing risks. Differences between the curves were evaluated using the Gray test.²⁰ RR describes the cumulative incidence of relapse. All calculations were made using IBM SPSS Statistics 23 and R Foundation for Statistical Computing 3.2.5. A P-value of <0.05 was considered statistically significant. Multivariate

analyses were performed to identify possible confounding variables such as gender match, disease risk, and acute GVHD.

3 | RESULTS

3.1 | Frequency of polymorphisms

We analyzed 88 patients and donors pairs. The heterozygote genotype AG of CTLA-4 SNP rs231775 was found in 42 donors (48%), AA in 35 donors (40%), and 11 donors were homozygous for GG (12%). The distribution of CTLA-4 SNPs with AG and AA (combined about 90%) and GG (about 10%) conform to several published studies.^{10,21,22}

3.2 | Event-free survival and overall survival

We observed a significant difference in EFS depending on the donor's genotype (Figure 1). The EFS was 70% or 46% if the patient was transplanted from a donor with CTLA-4 genotype AG/GG or AA of rs231775, respectively ($P = 0.025$). In view of these results, we examined a possible correlation between the donor's genotype and OS. We could identify a trend towards better OS of the recipients if the donor's genotype was AG/GG (77%) compared to AA (57%) with $P = 0.062$.

3.3 | Relapse rate

The analysis of the donor's CTLA-4 SNP has shown that the G allele was significantly associated with a reduced RR (Figure 2). Only 19% of the patients relapsed after receiving a transplant from donors with genotype AG or GG compared to 40% with genotype AA ($P = 0.026$). The RR was 25% vs 42% in patients with ALL, 14% versus 33% in patients with AML,

13% vs 33% in patients who were transplanted in first complete remission, and 30% vs 47% in patients who were transplanted in second complete remission after receiving a transplant from donors with genotype AG/GG compared to donors with genotype AA, respectively. Nineteen patients of the 58 patients with ALL (37%) relapsed. Fifty-eight percentage of the patients with relapsed ALL had a donor with the genotype AA, whereas only 38% of the patients with ALL who remained in complete remission had a donor with the genotype AA. Six of the 30 patients with AML (20%) relapsed. Fifty percentage of the patients with relapsed AML had a donor with the genotype AA, whereas only 25% of the patients with AML who remained in complete remission had a donor with the genotype AA. Ten of the 48 patients (21%) who were transplanted in first complete remission suffered from relapse. Sixty percentage of these patients who relapsed had a donor with the genotype AA, whereas only 32% of the patients who remained in first complete remission had a donor with the genotype AA. Fifteen of the 40 patients (38%) who were transplanted in second complete remission suffered from relapse. Fifty-three percentage of these patients who relapsed had a donor with the genotype AA, whereas only 36% of the patients who remained in second complete remission had a donor with the genotype AA. Furthermore, all patients had full donor chimerism until the relapse occurred.

3.4 | Acute and chronic graft-versus-host disease

Because of the well-known unfavorable effect of the GVHD on the patient's survival, we investigated a possible correlation between the donor's genotype and GVHD. There was no statistical impact of CTLA-4 SNP rs231775 on either acute GVHD (AG/GG 28.3% and AA 25.7% with $P = 0.877$) or chronic GVHD (AG/GG 24.5% and AA 11.4% with $P = 0.140$). We did not observe a graft failure in our cohort of patients.

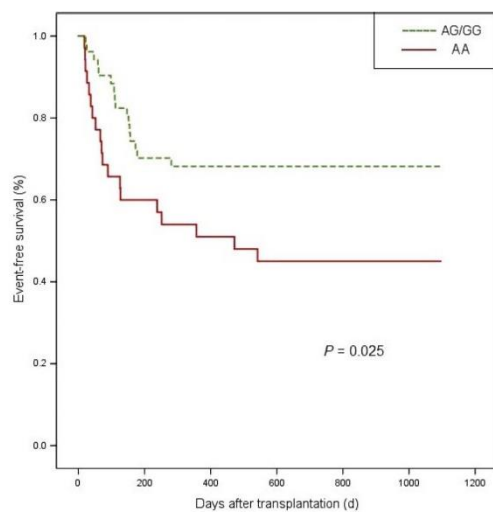


FIGURE 1 Event-free survival according to donor's single nucleotide polymorphism rs231775 status

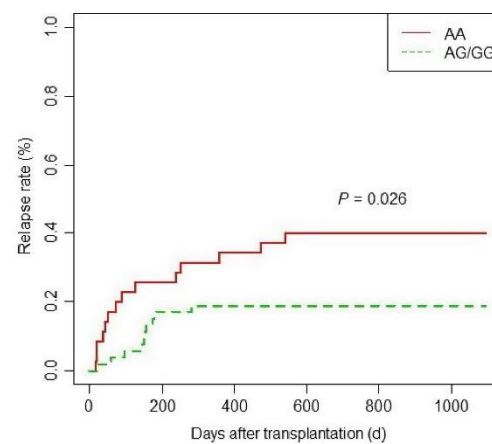


FIGURE 2 Relapse rate according to donor's single nucleotide polymorphism rs231775 status

| Variable | EFS | | RR | |
|-------------------------|---------------------|----------|----------------------|----------|
| | HR (95% CI) | <i>p</i> | HR (95% CI) | <i>p</i> |
| Donor CTLA-4 (rs231775) | 0.484 (0.184-0.942) | 0.035 | 0.416 (0.184-0.942) | 0.035 |
| Gender match | 0.855 (0.415-1.761) | 0.670 | 0.721 (0.290-1.793) | 0.481 |
| Disease risk | 1.845 (0.933-3.647) | 0.078 | 1.985 (0.869-4.536) | 0.985 |
| aGVHD grade II-IV | 0.850 (0.397-1.822) | 0.676 | 0.593 (0.214- 1.642) | 0.315 |

aGVHD, acute graft-versus-host disease; CTLA-4, cytotoxic T-lymphocyte antigen-4.

TABLE 2 Multivariate analysis: event-free survival (EFS) and relapse rate (RR)

3.5 | Univariate analysis

In univariate analysis only the donor's CTLA-4 genotype AG/GG or AA of rs231775 had a significant influence on EFS ($P = 0.025$). Neither donor type ($P = 0.331$), age at time of diagnosis ($P = 0.666$), gender of the patient ($P = 0.474$) nor status of remission at time of transplantation ($P = 0.063$) had a significant impact on EFS. In univariate analysis only the donor's CTLA-4 genotype AG/GG or AA had a significant influence on RR ($P = 0.026$). There was no statistically significant impact on RR by donor type ($P = 0.112$), age at time of diagnosis ($P = 0.888$), gender of the patient ($P = 0.317$), or status of remission ($P = 0.089$). In addition, the recipient's genotype of CTLA-4 SNP rs231775 had no significant effect on EFS ($P = 0.983$) and RR ($P = 0.596$).

3.6 | Multivariate analysis

Multivariate analysis was used to test whether the association between donor's CTLA-4 polymorphism and EFS and RR was affected by other factors. The results are presented in Table 2 and indicate that the rs231775 CTLA-4 SNP is an independent risk factor for EFS and RR. The donor's genotype was not significantly associated with transplant-related mortality, which is defined as death without a former sign of progression or relapse (AG/GG 11.3% and AA 14.3% with $P = 0.652$).

4 | DISCUSSION

In this paper, we would like to emphasize that the CTLA-4 polymorphism rs231775 has a decisive impact on RR and survival after allogeneic HSCT. As previously mentioned, the GVL effect seems to be essential to diminish relapse after allogeneic HSCT. However, more active T-cells could accompany with a higher rate of GVHD.^{11,17} In our study, we could not detect a higher incidence of GVHD ($P > 0.05$) which corresponds to other research groups that have analyzed independent pathways: Negrin³ summarized preclinical strategies showing that a separate manipulation of GVL and GVHD is possible. Zheng et al⁸ demonstrated that memory T-cells could mediate GVL without causing GVHD in mice.

The importance of CTLA-4 in the regulation of T-cell activity has been proven in several areas. First, Krummel and Allison¹³ described

that cross-linking of CTLA-4, T-cell receptor and CD28 strongly inhibits the proliferation of T-cell and decreases the IL-2 secretion. Second, Walunas et al²³ found that monoclonal antibodies specific for murine CTLA-4 augmented the proliferative response of T-cells, because the transduction of the inhibiting CTLA-4 was blocked. Furthermore, Kouki et al¹⁹ identified that anti-human CTLA-4 monoclonal antibodies of CTLA-4 increased the T-cell proliferation. They were able to demonstrate this dose-dependent manner in each of their investigated subgroup (patients with Grave's disease, Hashimoto's thyroiditis, and the control group). Third, considerations are found to use the blockade of CTLA-4 therapeutically. Fevery et al²⁴ discovered that a late blockade of CTLA-4 had a potent anti-leukemic effect while the donor-host tolerance remained untouched. However, the provided autoimmune mortality has yet to be managed. Correspondingly, Bashey et al²⁵ highlighted that a single infusion of human anti-CTLA-4 monoclonal antibody ipilimumab could produce antitumor response. Three patients (two with Hodgkin disease and one patient with mantle cell lymphoma) of the twenty-nine patients developed objective disease responses.

We hypothesized that the polymorphism rs231775 of CTLA-4 has an impact on its activity. Accordingly, Anjos et al¹⁶ explored that GG homozygotes expressed one third less CTLA-4 on cell surface than AA homozygotes, showing that this SNP of CTLA-4 affects its inhibitory function measurably.

Most importantly, we observed that the donor's genotype AG/GG of rs231775 CTLA-4 SNP is associated with a lower RR and better survival via down-regulation of the inhibitory CTLA-4 and consequently more active T-cells augmenting the GVL effect. In line with this thesis, Canossi et al²⁶ examined the association between the CTLA-4 SNP and acute rejection episodes in cadaveric renal transplantations and published the following results: the GG allele of CTLA-4 SNP rs231775 was associated with a decreased expression of fICTLA-4. Correspondingly, Mäurer et al¹⁸ surveyed the impact of CTLA-4 SNP rs231775 on T-cell activation in 64 donors. Their results revealed a significant correlation of the GG allele and decreased up-regulation of CTLA-4 upon T-cell activation. Additionally, Kouki et al¹⁹ demonstrated a direct correlation between CTLA-4 GG allele and an increased T-cell proliferation, as mentioned above.

In conclusion, we suggest that CTLA-4 polymorphism rs231775 could significantly influence RR and survival in children after HSCT. However, further pediatric multicenter studies with a larger number of patients are necessary to fully evaluate this thesis.

ACKNOWLEDGEMENTS

JH expresses her gratitude to the "José Carreras-Leukämie-Stiftung" for support via the "José Carreras-DGHO-Promotionsstipendium".

ETHICAL APPROVAL

All procedures were in accordance with the ethical standards. The study has been approved by the Jena University Hospital Ethics Committee (5154-05/17). Informed consent was obtained from all individual participants or the responsible persons included in the study.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- Hammrich J, Wittig S, Ernst T, Gruhn B. CTLA-4 polymorphisms: influence on transplant-related mortality and survival in children undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2018.
- Horowitz M, Gale R, Sondel P, et al. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood*. 1990;75(3):555-562.
- Negrin RS. Graft-versus-host disease versus graft-versus-leukemia. *Hematology*. 2015;2015(1):225-230.
- Kolb H, Schattenberg A, Goldman J, et al. Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. European Group for Blood and Marrow Transplantation Working Party Chronic Leukemia [see comments]. *Blood*. 1995;86(5):2041-2050.
- Kolb H-J. Graft-versus-leukemia effects of transplantation and donor lymphocytes. *Blood*. 2008;112(12):4371-4383.
- Mehta J. Graft-versus-Leukemia Reactions in Clinical Bone Marrow Transplantation. *Leukemia & Lymphoma*. 1993;10(6):427-432.
- Collins RH, Shpilberg O, Drobyski WR, et al. Donor leukocyte infusions in 140 patients with relapsed malignancy after allogeneic bone marrow transplantation. *J Clin Oncol*. 1997;15(2):433-444.
- Zheng H, Matte-Martone C, Li H, et al. Effector memory CD4⁺ T cells mediate graft-versus-leukemia without inducing graft-versus-host disease. *Blood*. 2008;111(4):2476-2484.
- Alatrash G, Daver N, Mittendorf EA. Targeting immune checkpoints in hematologic malignancies. *Pharmacol Rev*. 2016;68(4):1014-1025.
- Mossallam GI, Samra MA. CTLA-4 polymorphism and clinical outcome post allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Hum Immunol*. 2013;74(12):1643-1648.
- Sellami MH, Bani M, Torjeman L, et al. Effect of donor CTLA-4 alleles and haplotypes on graft-versus-host disease occurrence in Tunisian patients receiving a human leukocyte antigen-identical sibling hematopoietic stem cell transplant. *Hum Immunol*. 2011;72(2):139-143.
- Egen JG, Allison JP. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 accumulation in the immunological synapse is regulated by TCR signal strength. *Immunity*. 16(1), 23-35.
- Krummel MF, Allison JP. CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J Exp Med*. 1995;182(2):459-465.
- Laurent S, Palmisano GL, Martelli AM, et al. CTLA-4 expressed by chemoresistant, as well as untreated, myeloid leukaemia cells can be targeted with ligands to induce apoptosis. *Br J Haematol*. 2007;136(4):597-608.
- Fife BT, Griffin MD, Abbas AK, Locksley RM, Bluestone JA. Inhibition of T cell activation and autoimmune diabetes using a B cell surface-linked CTLA-4 agonist. *J Clin Invest*. 2006;116(8):2252-2261.
- Anjos S, Nguyen A, Ounissi-Benkalha H, Tessier M-C, Polychronakos C. A common autoimmunity predisposing signal peptide variant of the cytotoxic t-lymphocyte antigen 4 results in inefficient glycosylation of the susceptibility allele. *J Biol Chem*. 2002;277(48):46478-46486.
- Azarian M, Busson M, Lepage V, et al. Donor CTLA-4 +49 A/G*GG genotype is associated with chronic GVHD after HLA-identical haematopoietic stem-cell transplantations. *Blood*. 2007;110(13):4623-4624.
- Mäurer M, Loserth S, Kolb-Mäurer A, et al. A polymorphism in the human cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (CTLA4) gene (exon 1 +49) alters T-cell activation. *Immunogenetics*. 2002;54(1):1-8.
- Kouki T, Sawai Y, Gardine CA, Fisfalen M-E, Alegre M-L, DeGroot LJ. CTLA-4 gene polymorphism at position 49 in exon 1 reduces the inhibitory function of CTLA-4 and contributes to the pathogenesis of graves' disease. *J Immunol*. 2000;165(11):6606-6611.
- Gray RJ. A class of K-sample tests for comparing the cumulative incidence of a competing risk. *The Annals of Statistics*. 1988;16(3):1141-1154. <https://doi.org/10.1214/aos/1176350951>.
- Piccioli P, Balbi G, Serra M, et al. CTLA-4 +49A>G polymorphism of recipients of HLA-matched sibling allogeneic stem cell transplantation is associated with survival and relapse incidence. *Ann Hematol*. 2010;89(6):613-618.
- Perez-Garcia A, De la Camara R, Roman-Gomez J, et al. CTLA-4 polymorphisms and clinical outcome after allogeneic stem cell transplantation from HLA-identical sibling donors. *Blood*. 2007;110(1):461-467.
- Walunas TL, Lenschow DJ, Bakker CY, et al. Pillars Article: CTLA-4 can function as a negative regulator of t cell activation. *Immunity*. 1994. 1: 405-413. *J Immunol*. 2011; 187(7): 3466-3474.
- Fevry S, Billiau AD, Sprangers B, et al. CTLA-4 blockade in murine bone marrow chimeras induces a host-derived antileukemic effect without graft-versus-host disease. *Leukemia*. 2007;21:1451.
- Bashey A, Medina B, Corringham S, et al. CTLA4 blockade with ipilimumab to treat relapse of malignancy after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood*. 2009;113(7):1581-1588.
- Canossi A, Aureli A, Delreno F, et al. Influence of cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 polymorphisms on acute rejection onset of cadaveric renal transplants. *Transpl Proc*. 2013;45(7):2645-2649.

How to cite this article: Hammrich J, Wittig S, Ernst T, Gruhn B. CTLA-4 polymorphism rs231775: Influence on relapse and survival after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in childhood. *Eur J Haematol*. 2019;00:1-5. <https://doi.org/10.1111/ejh.13200>

5. Diskussion

5.1. rs3087243 (CT60) SNP

Das Ziel der vorliegenden Arbeit liegt darin, einen eventuellen Zusammenhang zwischen CTLA-4 SNPs und dem Erfolg der allogenen HSZT zu untersuchen.

Zu Beginn wurde der CT60 SNP analysiert, welcher in einem nicht-kodierenden Bereich des CTLA-4 Gens liegt und durch den Austausch von Adenin (A) und Guanin (G) definiert ist. Die Verteilung der einzelnen Variationen der 153 untersuchten Spender entsprach mit AG>GG>AA der Beobachtung anderer Studien mit großem Patientenkollektiv und sollte daher repräsentativ sein (Perez-Garcia et al. 2007).

Es konnte gezeigt werden, dass der CT60 Genotyp des Spenders einen signifikanten Einfluss auf das EFS hat. Das EFS der Patienten, welche ein Transplantat vom Genotyp GG erhielten, war mit 63,6 % signifikant besser als das der Patienten, welche Transplantaten vom Genotyp AG (46,2 %) und AA (32,3 %) erhielten ($P=0,043$). Durch multivariate Analyse waren wir in der Lage zu zeigen, dass CT60 ein unabhängiger Risikofaktor für das EFS ist.

Auch wenn unsere Ergebnisse die ersten sind, welche sich auf ein pädiatrisches Patientenkollektiv beziehen, gibt es in der Literatur zahlreiche Veröffentlichungen, welche sich mit dem Zusammenhang von CT60 und dem Erfolg der HSZT beschäftigen. Die Ergebnisse sind teils kontrovers und bedürfen daher der Diskussion. Die meisten Studien fokussieren sich auf die Endpunkte Überleben und Auftreten einer GVHD. Perez-Garcia et al. (2007) beschrieb, dass der CT60 Genotyp AA mit einem erhöhten Risiko für das Auftreten einer aGVHD assoziiert war, die Patienten aber dennoch eine bessere 5-Jahres Überlebensrate und eine geringere Rezidivrate aufwiesen. Auch Qin et al. (2016) postulierte, dass das Vorhandensein eines Guanins (GG oder AG) mit einer höheren Inzidenz einer cGVHD einherging als bei Patienten mit einem Spender des Genotyps AA. Ein signifikanter Zusammenhang zum Gesamtüberleben konnte nicht festgestellt werden. Dem gegenüber stehen die Ergebnisse von Karabon et al. (2015) und Xiao et al. (2012), welche eine geringeres Risiko für das Auftreten einer GVHD beschrieben, wenn die Patienten ein Transplantat von Spendern mit dem AA Genotyp erhielten. Wie auch Mossallam and Samra (2013) und Murase et al. (2011) konnten wir keinen signifikanten Zusammenhang zwischen den CT60 SNPs und dem Auftreten einer akuten oder chronischen GVHD feststellen.

Mögliche Ursachen für die beschriebenen Inkohärenzen liegen in unterschiedlichem Patienten- und Spenderkollektiv, verschiedenen Transplantationsprotokollen und Unterschieden in der GVHD-Prophylaxe.

Trotz der zum Teil widersprüchlichen Aussagen basieren einige Erklärungsmodelle auf den gleichen zugrundeliegenden Vorgängen, welche auch von unseren Ergebnissen bekräftigt werden: Wie in den einleitenden Worten beschrieben, existiert CTLA-4 in zwei Isoformen. Das flCTLA-4 inhibiert die T-Zell-Aktivierung über die Bindung an CD80 und CD86 (Krummel and Allison 1995; Schwartz 2003; Jagasia et al. 2012). Das sCTLA-4 antagonisiert eben diesen Vorgang, sodass die Immunantwort in Balance gehalten wird. Es wird vermutet, dass durch das Vorliegen eines A-Allels im CT60 die Expression von sCTLA-4 gesteigert wird. Dies hat zur Folge, dass die T-Zellen weniger inhibiert werden und deren Immunantwort stärker ausfällt (Ueda et al. 2003; Perez-Garcia et al. 2007; Qin et al. 2016). Diese Schlussfolgerung erklärt einerseits das vermehrte Auftreten einer GVHD, wenn Patienten Stammzellen mit dem AA SNP des CT60 erhalten. Andererseits ist bei aktiveren Spender-T-Zellen auch der GvL-Effekt verstärkt, welcher die Zerstörung residueller Leukämiezellen durch die Spender-T-Zellen beschreibt. Folglich wäre eine geringere Rezidivrate zu vermuten.

Des Weiteren kann auch der von uns gezeigte Einfluss auf die TRM durch die je nach SNP unterschiedliche T-Zell-Aktivität erklärt werden. Die Rate der TRM war mit 9,1 % signifikant ($P=0,013$) niedriger, wenn die Patienten einen Spender mit dem Genotyp GG hatten, als mit Stammzellen des Genotyps AG (19,2 %) oder AA (35,5 %). Die beiden Hauptursachen der TRM waren mit einem Anteil von jeweils 33,3 % eine Infektion und Multiorganversagen. Wir vermuten, dass bei Vorliegen des GG-Allels die T-Zell-Aktivität durch das veränderte Verhältnis von flCTLA-4 und sCTLA-4 so reguliert wird, dass einerseits eine ausreichende Infektabwehr gewährleistet ist. Diese verhindert schwere bakterielle, virale und parasitäre Infektionen als Todesursache. Andererseits wird eine überschießende Immunreaktion durch die verstärkte Inhibition der T-Zellen verhindert und damit das Risiko für eine GVHD oder Multiorganversagen reduziert. Die genannte Hypothese stimmt mit den Beobachtungen von Bosch-Vizcaya et al. (2012) überein. Diese beschrieben einen nicht-signifikanten Trend zu einer erhöhten TRM-Rate bei Patienten, welche Stammzellen eines Spenders mit Genotyp AA erhielten.

5.2. rs231775 (+49G/A) SNP

Wie oben dargelegt, gelang es uns, einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem CT60 SNP und TRM festzustellen, jedoch hatten die Polymorphismen scheinbar keinen Einfluss auf die Rezidivrate.

Da die Rezidive jedoch ein bedeutender Einfluss auf den Erfolg einer HSZT darstellen, schlossen wir weitere Untersuchungen an. Unter Kenntnis der immunmodulatorischen Funktionen des CTLA-4 vermuteten wir weiterhin einen möglichen Zusammenhang zwischen CTLA-4 SNPs und Rezidivrate. Gerade die Rezidivrate ist abhängig von der zugrundeliegenden Erkrankung; deswegen schlossen wir in der +49A/G Analyse nur ALL und AML Patienten ein. Außerdem wurden nur Patienten analysiert, welche zum Zeitpunkt der Transplantation in erster oder zweiter vollständiger Remission waren. Für Patienten, welche sich nicht in Remission befanden, übertraf vermutlich das Risiko Transplantations-assoziiierter Komplikationen das Risiko des Rezidivs. Rezidive entstehen, wenn sich nach der Konditionierung verbliebene residuelle Leukämiezellen im Patienten erneut vermehren. Da selten alle malignen Zellen durch die Polychemotherapie eradiziert werden können, spielen die T-Zellen des Spenders eine wichtige Rolle, um einen erneuten Krankheitsausbruch zu verhindern. Das Abtöten der residuellen Tumorzellen durch die T-Zellen des Spenders wird als Graft-versus-Leukemia (GvL)- Effekt bezeichnet. Neben dieser gewünschten Funktion können die T-Zellen aber auch eine GVHD auslösen. Bereits Horowitz et al. (1990) postulierte, dass Patienten vom GvL-Effekt profitieren können, ohne dass ein erhöhtes GVHD-Risiko zu verzeichnen ist. Ähnliches berichtete Kolb et al. (1995): In erster Linie bei Patienten mit rezidivierender chronisch myeloischer Leukämie (CML), aber auch bei Patienten mit AML konnte durch Transfusion von Spender-Lymphozyten eine Remission erzielt werden. Im Vergleich zu Alternativmethoden wurde das Risiko einer GVHD als annehmbar beschrieben. Damit im Einklang postulierte Kolb (2008), dass die Transfusion von Spender-Lymphozyten nach T-Zell-depletierter HSZT über den GvL-Effekt wirksam ist, ohne eine GVHD auszulösen. Negrin (2015) diskutierte in seiner Übersichtsarbeit die Abhängigkeit von GVHD und GvL-Effekt. Zusammenfassend zeigten präklinische Modelle, dass es möglich ist, die positive Wirkung des GvL-Effekts zu steigern und gleichzeitig das Risiko der GVHD zu minimieren.

Die tatsächliche Umsetzung im klinischen Setting gestaltet sich bisher jedoch schwierig und bleibt Gegenstand aktueller Studien. Beispielsweise zeigte Zheng et al. (2008) in Mausmodellen, dass T-Gedächtniszellen den GvL-Effekt bewirken, ohne dabei eine GVHD auszulösen.

Somit lässt sich angesichts zahlreicher Analysen zusammenfassen, dass der GvL-Effekt, vermittelt durch T-Zellen, einen Einfluss auf die Rezidivrate hat. Die Aktivität der T-Zellen wiederum wird, wie oben beschrieben, durch CTLA-4 reguliert. Polymorphismen beeinflussen den Aktivitätsmodus des CTLA-4. Unsere Analysen ergaben, dass die Rezidivrate von Patienten, welche Stammzellen von einem Spender mit mindestens einem G-Allel des +49A/G erhielten, signifikant niedriger war ($P=0,026$). In Einklang mit den Kenntnissen über die Funktionsweise von CTLA-4 lässt sich dieses Ergebnis wie folgt erläutern: Das Vorkommen eines G-Allels bedingt vermutlich eine verminderte Aktivität des inhibitorischen CTLA-4. In Folge dessen sind die T-Zellen aktiver und der GvL-Effekt wird gesteigert. Dies stimmt mit den Ergebnissen von Anjos et al. (2002) überein: Liegt ein GG-Allel vor, ist im Vergleich zum AA-Genotyp die Expression von CTLA-4 auf der Zelloberfläche auf ein Drittel reduziert. Auch Canossi et al. (2013) zeigten, dass das GG-Allel des +49A/G SNPs mit einer verminderten Expression von flCTLA-4 assoziiert ist. Überdies beschrieb Kouki et al. (2000) eine erhöhte T-Zell-Aktivität bei Vorliegen des GG-Allels. Dieselbe Korrelation wurde von Maurer et al. (2002) bestätigt.

Damit stimmen unsere Ergebnisse mit denen anderer Publikationen überein und lassen sich unter Kenntnis der Funktion von CTLA-4 und dessen Polymorphismen logisch erläutern. Dennoch muss abschließend erwähnt werden, dass größere multizentrische Studien nötig sind, um die Relevanz der Ergebnisse zu bestätigen.

6. Schlussfolgerungen

Aus den hier vorliegenden Forschungsergebnissen geht hervor, dass es einen signifikanten Zusammenhang zwischen den SNPs des CTLA-4 und dem Erfolg der allogenen HSZT im Kindesalter gibt. Wir konnten in den Analysen von zwei unterschiedlichen Polymorphismen einen signifikanten Einfluss auf Überleben, TRM und Rezidivrate feststellen. Die Ergebnisse standen im Einklang mit entsprechenden Publikationen. Diese sind jedoch meist auf adulte Patientenkollektive bezogen, sodass weitere Studien im Bereich der Kinder- und Jugendmedizin notwendig sind, um die Ergebnisse entsprechend zu evaluieren. Falls sich unsere Resultate in großen, multizentrischen Studien bestätigen lassen, wäre damit eventuell ein neuer Screening- und Prognosefaktor für die allogene HSZT im Kindesalter gefunden.

7. Literaturverzeichnis

- Ahmadian, Afshin, Baback Gharizadeh, Anna C. Gustafsson, Fredrik Sterky, Pål Nyrén, Mathias Uhlén, and Joakim Lundeberg. 2000. 'Single-Nucleotide Polymorphism Analysis by Pyrosequencing', *Analytical Biochemistry*, 280: 103-10.
- Alatrash, Gheath, Naval Daver, and Elizabeth A. Mittendorf. 2016. 'Targeting Immune Checkpoints in Hematologic Malignancies', *Pharmacological Reviews*, 68: 1014-25.
- Alegre, Maria-Luisa, Kenneth A. Frauwirth, and Craig B. Thompson. 2001. 'T-cell regulation by CD28 and CTLA-4', *Nature Reviews Immunology*, 1: 220-28.
- Anjos, Suzana, Audrey Nguyen, Houria Ounissi-Benkhalha, Marie-Catherine Tessier, and Constantin Polychronakos. 2002. 'A Common Autoimmunity Predisposing Signal Peptide Variant of the Cytotoxic T-lymphocyte Antigen 4 Results in Inefficient Glycosylation of the Susceptibility Allele', *Journal of Biological Chemistry*, 277: 46478-86.
- Arber, Daniel A., Attilio Orazi, Robert Hasserjian, Jürgen Thiele, Michael J. Borowitz, Michelle M. Le Beau, Clara D. Bloomfield, Mario Cazzola, and James W. Vardiman. 2016. 'The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia', *Blood*, 127: 2391.
- AWMF. 2016. 'Akute lymphoblastische Leukämie - ALL - im Kindesalter', Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V., Accessed 20.06.2019. https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/025-014l_S1_Akute_lymphoblastische_Leukaemie_ALL_2016-04.pdf.
- . 2019. 'Akute myeloische Leukämie-AML- im Kindes- und Jugendalter', Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V., Accessed 23.06.2019. https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/025-031l_S1_Akute-myeloische-Leukaemie%E2%80%93AML%E2%80%93Kinder-Jugendliche_2019-03.pdf.
- Bader, Peter, Hermann Kreyenberg, Arend von Stackelberg, Cornelia Eckert, Emilia Salzmann-Manrique, Roland Meisel, Ulrike Poetschger, Daniel Stachel, Martin Schrappe, Julia Alten, Andre Schrauder, Ansgar Schulz, Peter Lang, Ingo Müller, Michael H. Albert, Andre M. Willasch, Thomas E. Klingebiel, and Christina Peters. 2015. 'Monitoring of Minimal Residual Disease After Allogeneic Stem-Cell Transplantation in Relapsed Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Allows for the Identification of Impending Relapse: Results of the ALL-BFM-SCT 2003 Trial', *Journal of Clinical Oncology*, 33: 1275-84.
- Bosch-Vizcaya, Anna, Arianne Pérez-García, Salut Brunet, Carlos Solano, Ismael Buño, Vicent Guillem, Carolina Martínez-Laperche, Guillermo Sanz, Cristina Barrenetxea, Carmen Martínez, Esperanza Tuset, Natàlia Lloveras, Rosa Coll, Ramon Guardia, Yolanda González, Josep M. Roncero, Anna Bustins, Santiago Gardella, Cristalina Fernández, Joan Buch, and David Gallardo. 2012. 'Donor CTLA-4 Genotype Influences Clinical Outcome after T Cell-Depleted Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation from HLA-Identical Sibling Donors', *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 18: 100-05.
- Brookes, Anthony J. 1999. 'The essence of SNPs', *Gene*, 234: 177-86.
- Canossi, A., A. Aureli, F. Delreno, S. Iesari, C. Cervelli, K. Clemente, A. Famulari, F. Pisani, and F. Papola. 2013. 'Influence of Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen-4 Polymorphisms on Acute Rejection Onset of Cadaveric Renal Transplants', *Transplantation Proceedings*, 45: 2645-49.
- Cargill, Michele, David Altshuler, James Ireland, Pamela Sklar, Kristin Ardlie, Nila Patil, Charles R. Lane, Esther P. Lim, Nilesh Kalyanaraman, James Nemesh, Liuda Ziaugra, Lisa Friedland, Alex Rolfe, Janet Warrington, Robert Lipshutz, George Q. Daley, and Eric S. Lander. 1999. 'Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes', *Nature Genetics*, 22: 231-38.
- Chaplin, David D. 2010. 'Overview of the immune response', *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125: S3-S23.

- Chikuma, Shunsuke. 2017. 'CTLA-4, an Essential Immune-Checkpoint for T-Cell Activation.' in Akihiko Yoshimura (ed.), *Emerging Concepts Targeting Immune Checkpoints in Cancer and Autoimmunity* (Springer International Publishing: Cham).
- Cichon, Sven. 2002. 'Variabilität im menschlichen Genom: Bedeutung für die Krankheitsforschung', *Dtsch Arztebl International*, 99: A-3091.
- Collins, Francis S., Lisa D. Brooks, and Aravinda Chakravarti. 1998. 'A DNA Polymorphism Discovery Resource for Research on Human Genetic Variation', *Genome Research*, 8: 1229-31.
- Cota, Allwyn M., and Mark J. Midwinter. 2015. 'The immune system', *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*, 16: 353-55.
- Creutzig, U., M. Zimmermann, J. P. Bourquin, M. N. Dworzak, B. Kremens, T. Lehrnbecher, C. von Neuhoff, A. Sander, A. von Stackelberg, I. Schmid, J. Starý, D. Steinbach, J. Vormoor, and D. Reinhardt. 2011. 'Favorable outcome in infants with AML after intensive first- and second-line treatment: an AML-BFM study group report', *Leukemia*, 26: 654.
- Dranoff, Glenn. 2004. 'Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy', *Nature Reviews Cancer*, 4: 11-22.
- DRST. 2018. 'Jahresbericht 2017', Deutsches Register für Stammzelltransplantationen e.V., Accessed 10.06.2019. <http://www.drst.de/drst/download/jb2017.pdf>.
- Eckert, Cornelia, Günter Henze, Karlheinz Seeger, Nikola Hagedorn, Georg Mann, Renate Panzer-Grümayer, Christina Peters, Thomas Klingebiel, Arndt Borkhardt, Martin Schrappe, André Schrauder, Gabriele Escherich, Lucie Sramkova, Felix Niggli, Johann Hitzler, and Arend von Stackelberg. 2013. 'Use of Allogeneic Hematopoietic Stem-Cell Transplantation Based on Minimal Residual Disease Response Improves Outcomes for Children With Relapsed Acute Lymphoblastic Leukemia in the Intermediate-Risk Group', *Journal of Clinical Oncology*, 31: 2736-42.
- Einsele, H., and L. Kanz. 1999. 'Allogene Stammzelltransplantation', *Der Internist*, 40: 1249-56.
- Fife, Brian T., and Jeffrey A. Bluestone. 2008. 'Control of peripheral T-cell tolerance and autoimmunity via the CTLA-4 and PD-1 pathways', *Immunological Reviews*, 224: 166-82.
- Fleischer, B. 2011. 'Physiologie und Pathophysiologie des Immunsystems.' in Volker Kiefel and C. Mueller-Eckhardt (eds.), *Transfusionsmedizin und Immunhämatologie: Grundlagen – Therapie – Methodik* (Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg).
- Hemmati, Philipp G. 2018. 'Allogene Stammzelltransplantation', *best practice onkologie*, 13: 128-36.
- Hood, Leroy, and David Galas. 2003. 'The digital code of DNA', *Nature*, 421: 444-48.
- Horowitz, Mary M. 2012. 'Does matched unrelated donor transplantation have the same outcome as matched sibling transplantation in unselected patients?', *Best Practice & Research Clinical Haematology*, 25: 483-86.
- Horowitz, MM, RP Gale, PM Sondel, JM Goldman, J Kersey, HJ Kolb, AA Rimm, O Ringden, C Rozman, and B Speck. 1990. 'Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation', *Blood*, 75: 555-62.
- immunology, society for mucosal. 2014. 'Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Allele Frequency DNA Pools', Accessed 28.07.2019. <http://www.socmucimm.org/single-nucleotide-polymorphism-snp-allele-frequency-estimation-dna-pools-using-pyrosequencing/>.
- International Human Genome Sequencing, Consortium. 2004. 'Finishing the euchromatic sequence of the human genome', *Nature*, 431: 931-45.
- Jagasia, M., W. B. Clark, K. D. Brown-Gentry, D. C. Crawford, K. H. Fan, H. Chen, A. Kassim, J. P. Greer, B. G. Engelhardt, and B. N. Savani. 2012. 'Genetic variation in donor CTLA-4 regulatory region is a strong predictor of outcome after allogeneic hematopoietic cell transplantation for hematologic malignancies', *Biol Blood Marrow Transplant*, 18: 1069-75.
- João H. Duarte, Associate Editor Nature Biomedical Engineering. 2016. 'Genetic basis of class switching', Springer Nature, Accessed 15.08.2019.
- Karabon, Lidia, Mirosław Markiewicz, Anna Partyka, Edyta Pawlak-Adamska, Anna Tomkiewicz, Monika Dzierzak-Mietla, Sławomira Kyrz-Krzemien, and Irena Frydecka. 2015. 'A CT60G>A polymorphism in the CTLA-4 gene of the recipient may confer susceptibility to acute graft

- versus host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation', *Immunogenetics*, 67: 295-304.
- Kolb, Hans-Jochem. 2008. 'Graft-versus-leukemia effects of transplantation and donor lymphocytes', *Blood*, 112: 4371-83.
- Kolb, HJ, A Schattenberg, JM Goldman, B Hertenstein, N Jacobsen, W Arcese, P Ljungman, A Ferrant, L Verdonck, and D Niederwieser. 1995. 'Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. European Group for Blood and Marrow Transplantation Working Party Chronic Leukemia [see comments]', *Blood*, 86: 2041-50.
- Kouki, Tsuyoshi, Yoshikuni Sawai, Cyprian A. Gardine, Maria-Elena Fisfalen, Maria-Luisa Alegre, and Leslie J. DeGroot. 2000. 'CTLA-4 Gene Polymorphism at Position 49 in Exon 1 Reduces the Inhibitory Function of CTLA-4 and Contributes to the Pathogenesis of Graves' Disease', *The Journal of Immunology*, 165: 6606-11.
- Krummel, Matthew F, and James P Allison. 1995. 'CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation', *The journal of experimental medicine*, 182: 459-65.
- Landegren, Ulf, Mats Nilsson, and Pui-Yan Kwok. 1998. 'Reading Bits of Genetic Information: Methods for Single-Nucleotide Polymorphism Analysis', *Genome Research*, 8: 769-76.
- Lander, Eric S., Lauren M. Linton, Bruce Birren, Chad Nusbaum, Michael C. Zody, Jennifer Baldwin, Keri Devon, Ken Dewar, Michael Doyle, William FitzHugh, Roel Funke, Diane Gage, Katrina Harris, Andrew Heaford, John Howland, Lisa Kann, Jessica Lehoczky, Rosie LeVine, Paul McEwan, Kevin McKernan, James Meldrim, Jill P. Mesirov, Cher Miranda, William Morris, Jerome Naylor, Christina Raymond, Mark Rosetti, Ralph Santos, Andrew Sheridan, Carrie Sougnez, Nicole Stange-Thomann, Nikola Stojanovic, Aravind Subramanian, Dudley Wyman, Jane Rogers, John Sulston, Rachael Ainscough, Stephan Beck, David Bentley, John Burton, Christopher Clee, Nigel Carter, Alan Coulson, Rebecca Deadman, Panos Deloukas, Andrew Dunham, Ian Dunham, Richard Durbin, Lisa French, Darren Grafham, Simon Gregory, Tim Hubbard, Sean Humphray, Adrienne Hunt, Matthew Jones, Christine Lloyd, Amanda McMurray, Lucy Matthews, Simon Mercer, Sarah Milne, James C. Mullikin, Andrew Mungall, Robert Plumb, Mark Ross, Ratna Shownkeen, Sarah Sims, Robert H. Waterston, Richard K. Wilson, LaDeana W. Hillier, John D. McPherson, Marco A. Marra, Elaine R. Mardis, Lucinda A. Fulton, Asif T. Chinwalla, Kymberlie H. Pepin, Warren R. Gish, Stephanie L. Chisoe, Michael C. Wendl, Kim D. Delehaunty, Tracie L. Miner, Andrew Delehaunty, Jason B. Kramer, Lisa L. Cook, Robert S. Fulton, Douglas L. Johnson, Patrick J. Minx, Sandra W. Clifton, Trevor Hawkins, Elbert Branscomb, Paul Predki, Paul Richardson, Sarah Wenning, Tom Slezak, Norman Doggett, Jan-Fang Cheng, Anne Olsen, Susan Lucas, Christopher Elkin, Edward Uberbacher, Marvin Frazier, Richard A. Gibbs, Donna M. Muzny, Steven E. Scherer, John B. Bouck, Erica J. Sodergren, Kim C. Worley, Catherine M. Rives, James H. Gorrell, Michael L. Metzker, Susan L. Naylor, Raju S. Kucherlapati, David L. Nelson, George M. Weinstock, Yoshiyuki Sakaki, Asao Fujiyama, Masahira Hattori, Tetsushi Yada, Atsushi Toyoda, Takehiko Itoh, Chiharu Kawagoe, Hidemi Watanabe, Yasushi Totoki, Todd Taylor, Jean Weissenbach, Roland Heilig, William Saurin, Francois Artiguenave, Philippe Brottier, Thomas Bruls, Eric Pelletier, Catherine Robert, Patrick Wincker, André Rosenthal, Matthias Platzer, Gerald Nyakatura, Stefan Taudien, Andreas Rump, Douglas R. Smith, Lynn Doucette-Stamm, Marc Rubenfield, Keith Weinstock, Hong Mei Lee, JoAnn Dubois, Huanming Yang, Jun Yu, Jian Wang, Guyang Huang, Jun Gu, Leroy Hood, Lee Rowen, Anup Madan, Shizen Qin, Ronald W. Davis, Nancy A. Federspiel, A. Pia Abola, Michael J. Proctor, Bruce A. Roe, Feng Chen, Huaqin Pan, Julianne Ramser, Hans Lehrach, Richard Reinhardt, W. Richard McCombie, Melissa de la Bastide, Neilay Dedhia, Helmut Blöcker, Klaus Hornischer, Gabriele Nordsiek, Richa Agarwala, L. Aravind, Jeffrey A. Bailey, Alex Bateman, Serafim Batzoglou, Ewan Birney, Peer Bork, Daniel G. Brown, Christopher B. Burge, Lorenzo Cerutti, Hsiu-Chuan Chen, Deanna Church, Michele Clamp, Richard R. Copley, Tobias Doerks, Sean R. Eddy, Evan E. Eichler, Terrence S. Furey, James Galagan, James G. R. Gilbert, Cyrus Harmon, Yoshihide Hayashizaki, David Haussler, Henning Hermjakob, Karsten Hokamp, Wonhee Jang, L. Steven Johnson, Thomas A. Jones,

- Simon Kasif, Arek Kasprzyk, Scot Kennedy, W. James Kent, Paul Kitts, Eugene V. Koonin, Ian Korf, David Kulp, Doron Lancet, Todd M. Lowe, Aoife McLysaght, Tarjei Mikkelsen, John V. Moran, Nicola Mulder, Victor J. Pollara, Chris P. Ponting, Greg Schuler, Jörg Schultz, Guy Slater, Arian F. A. Smit, Elia Stupka, Joseph Szustakowski, Danielle Thierry-Mieg, Jean Thierry-Mieg, Lukas Wagner, John Wallis, Raymond Wheeler, Alan Williams, Yuri I. Wolf, Kenneth H. Wolfe, Shiaw-Pyng Yang, Ru-Fang Yeh, Francis Collins, Mark S. Guyer, Jane Peterson, Adam Felsenfeld, Kris A. Wetterstrand, Richard M. Myers, Jeremy Schmutz, Mark Dickson, Jane Grimwood, David R. Cox, Maynard V. Olson, Rajinder Kaul, Christopher Raymond, Nobuyoshi Shimizu, Kazuhiko Kawasaki, Shinsei Minoshima, Glen A. Evans, Maria Athanasiou, Roger Schultz, Aristides Patrinos, Michael J. Morgan, Consortium International Human Genome Sequencing, Center for Genome Research Whitehead Institute for Biomedical Research, Centre The Sanger, Center Washington University Genome Sequencing, Us Doe Joint Genome Institute, Center Baylor College of Medicine Human Genome Sequencing, Riken Genomic Sciences Center, Genoscope, U. M. R. Cnrs, Institute of Molecular Biotechnology Department of Genome Analysis, G. T. C. Sequencing Center, Center Beijing Genomics Institute/Human Genome, The Institute for Systems Biology Multimegabase Sequencing Center, Center Stanford Genome Technology, Technology University of Oklahoma's Advanced Center for Genome, Genetics Max Planck Institute for Molecular, Lita Annenberg Hazen Genome Center Cold Spring Harbor Laboratory, G. BF—German Research Centre for Biotechnology, Group *Genome Analysis, U. S. National Institutes of Health Scientific management: National Human Genome Research Institute, Center Stanford Human Genome, Center University of Washington Genome, Keio University School of Medicine Department of Molecular Biology, Dallas University of Texas Southwestern Medical Center at, U. S. Department of Energy Office of Science, and Trust The Wellcome. 2001. 'Initial sequencing and analysis of the human genome', *Nature*, 409: 860-921.
- Linsley, Peter S., Jeff Bradshaw, JoAnne Greene, Robert Peach, Kelly L. Bennett, and Robert S. Mittler. 1996. 'Intracellular Trafficking of CTLA-4 and Focal Localization Towards Sites of TCR Engagement', *Immunity*, 4: 535-43.
- Locatelli, Franco, Peter Nöllke, Marco Zecca, Elisabeth Korthof, Edoardo Lanino, Christina Peters, Andrea Pession, Hartmut Kabisch, Cornelio Uderzo, Carmen S. Bonfim, Peter Bader, Dagmar Dilloo, Jan Stary, Alexandra Fischer, Tom Révész, Monika Führer, Henrik Hasle, Monika Trebo, Marry M. van den Heuvel-Eibrink, Susanna Fenu, Brigitte Strahm, Giovanna Giorgiani, Mario Regazzi Bonora, Ulrich Duffner, and Charlotte M. Niemeyer. 2005. 'Hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in children with juvenile myelomonocytic leukemia (JMML): results of the EWO-MDS/EBMT trial', *Blood*, 105: 410.
- Lozano Cerrada, Sara, Syed Y. Altaf, and Eduardo Olavarria. 2018. 'Allogeneic stem cell transplantation from unrelated donors in acute leukaemia', *Current Opinion in Oncology*, 30: 418-24.
- Magistrelli, Giovanni, Pascale Jeannin, Nathalie Herbault, Amélie Benoit de Coignac, Jean-François Gauchat, Jean-Yves Bonnefoy, and Yves Delneste. 1999. 'A soluble form of CTLA-4 generated by alternative splicing is expressed by nonstimulated human T cells', *European Journal of Immunology*, 29: 3596-602.
- Mak, Tak W., Mary E. Saunders, and Bradley D. Jett. 2014. 'Chapter 8 - The T Cell Receptor: Proteins and Genes.' in Tak W. Mak, Mary E. Saunders and Bradley D. Jett (eds.), *Primer to the Immune Response (Second Edition)* (Academic Cell: Boston).
- Mäurer, Mathias, Silke Loserth, Annette Kolb-Mäurer, Anke Ponath, Stefan Wiese, Niels Kruse, and Peter Rieckmann. 2002. 'A polymorphism in the human cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (CTLA4) gene (exon 1 +49) alters T-cell activation', *Immunogenetics*, 54: 1-8.
- Mayatepek, Ertan. 2019. *Pädiatrie Grundlagen, Klinik und Praxis*.
- Medina, Kay L. 2016. 'Chapter 4 - Overview of the immune system.' in Sean J. Pittock and Angela Vincent (eds.), *Handbook of Clinical Neurology* (Elsevier).

- Middeke, J. M., and J. Schetelig. 2018. 'Kapitel 88 - Allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation.' in T. Sauerbruch, T. Benzing, T. Bieber, H. C. Diener, P. Falkai, B. M. Ghadimi, Heinz Kölbl, B. Manger, S. C. Müller, F. Nauck, G. Nickenig, W. Niebling, K. Parhofer, W. Rascher, R. J. Schulz, H. Serve, M. M. Weber, U. Voderholzer and C. Vogelmeier (eds.), *Therapie-Handbuch* (Urban & Fischer: Munich).
- Mossallam, G. I., and M. A. Samra. 2013. 'CTLA-4 polymorphism and clinical outcome post allogeneic hematopoietic stem cell transplantation', *Hum Immunol*, 74: 1643-8.
- Murase, M., T. Nishida, M. Onizuka, Y. Inamoto, K. Sugimoto, N. Imahashi, M. Murata, K. Miyamura, Y. Kadera, H. Inoko, and T. Naoe. 2011. 'Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 haplotype correlates with relapse and survival after allogeneic hematopoietic SCT', *Bone Marrow Transplant*, 46: 1444-49.
- Murphy, Kenneth M., Casey Weaver, Charles Janeway, and Lothar Seidler. 2018. *Janeway Immunologie*.
- Negrin, Robert S. 2015. 'Graft-versus-host disease versus graft-versus-leukemia', *ASH Education Program Book*, 2015: 225-30.
- O'Halloran, Katrina, A. Kim Ritchey, Miroslav Djokic, and Erika Friebling. 2017. 'Transient juvenile myelomonocytic leukemia in the setting of PTPN11 mutation and Noonan syndrome with secondary development of monosomy 7', *Pediatric Blood & Cancer*, 64: e26408.
- Parkin, Jacqueline, and Bryony Cohen. 2001. 'An overview of the immune system', *The Lancet*, 357: 1777-89.
- Perez-Garcia, A., R. De la Camara, J. Roman-Gomez, A. Jimenez-Velasco, M. Encuentra, J. B. Nieto, J. de la Rubia, A. Urbano-Ispizua, S. Brunet, A. Iriando, M. Gonzalez, D. Serrano, I. Espigado, C. Solano, J. M. Ribera, J. M. Pujal, M. Hoyos, D. Gallardo, and G. VHD/Immunotherapy Committee of the Spanish Group of Hematopoietic Stem Cell Transplantation. 2007. 'CTLA-4 polymorphisms and clinical outcome after allogeneic stem cell transplantation from HLA-identical sibling donors', *Blood*, 110: 461-7.
- Purohit, Sharad, Robert Podolsky, Christin Collins, Weipeng Zheng, Desmond Schatz, Andy Muir, Diane Hopkins, Yi-Hua Huang, and Jin-Xiong She. 2005. 'Lack of correlation between the levels of soluble cytotoxic T-lymphocyte associated antigen-4 (CTLA-4) and the CT-60 genotypes', *Journal of Autoimmune Diseases*, 2: 8-8.
- Qin, X. Y., Y. Wang, G. X. Li, Y. Z. Qin, F. R. Wang, L. P. Xu, H. Chen, W. Han, J. Z. Wang, X. H. Zhang, Y. J. Chang, K. Y. Liu, Z. F. Jiang, and X. J. Huang. 2016. 'CTLA-4 polymorphisms and haplotype correlate with survival in ALL after allogeneic stem cell transplantation from related HLA-haplotype-mismatched donor', *J Transl Med*, 14: 100.
- Reinhardt, D., C. Von Neuhoff, A. Sander, and U. Creutzig. 2012. 'Prognostische Relevanz genetischer Aberrationen der akuten myeloischen Leukämie bei Kindern und Jugendlichen', *Klin Padiatr*, 224: 372-76.
- Rudd, Christopher E., Alison Taylor, and Helga Schneider. 2009. 'CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction', *Immunological Reviews*, 229: 12-26.
- Sachidanandam, Ravi, David Weissman, Steven C. Schmidt, Jerzy M. Kakol, Lincoln D. Stein, Gabor Marth, Steve Sherry, James C. Mullikin, Beverley J. Mortimore, David L. Willey, Sarah E. Hunt, Charlotte G. Cole, Penny C. Coggill, Catherine M. Rice, Zemin Ning, Jane Rogers, David R. Bentley, Pui-Yan Kwok, Elaine R. Mardis, Raymond T. Yeh, Brian Schultz, Lisa Cook, Ruth Davenport, Michael Dante, Lucinda Fulton, LaDeana Hillier, Robert H. Waterston, John D. McPherson, Brian Gilman, Stephen Schaffner, William J. Van Etten, David Reich, John Higgins, Mark J. Daly, Brendan Blumenstiel, Jennifer Baldwin, Nicole Stange-Thomann, Michael C. Zody, Lauren Linton, Eric S. Lander, David Altshuler, S. N. P. Map Working Group The International, Laboratories Cold Spring Harbor, Information National Center for Biotechnology, Centre The Sanger, Louis Washington University in St, and M. I. T. Center for Genome Research Whitehead. 2001. 'A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms', *Nature*, 409: 928-33.

- Sakashita, Kazuo, Kazuyuki Matsuda, and Kenichi Koike. 2016. 'Diagnosis and treatment of juvenile myelomonocytic leukemia', *Pediatrics International*, 58: 681-90.
- Salama, April K.S., and F. Stephen Hodi. 2011. 'Cytotoxic T-Lymphocyte–Associated Antigen-4', *Clinical Cancer Research*, 17: 4622-28.
- Santiago, Raoul, Stéphanie Vairy, Daniel Sinnett, Maja Krajinovic, and Henrique Bittencourt. 2017. 'Novel therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia', *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 18: 1081-99.
- Schwartz, Ronald H. 2003. 'T Cell Anergy', *Annual Review of Immunology*, 21: 305-34.
- Shaw, Peter J., Fangyu Kan, Kwang Woo Ahn, Stephen R. Spellman, Mahmoud Aljurf, Mouhab Ayas, Michael Burke, Mitchell S. Cairo, Allen R. Chen, Stella M. Davies, Haydar Frangoul, James Gajewski, Robert Peter Gale, Kamar Godder, Gregory A. Hale, Martin B. A. Heemskerk, John Horan, Naynesh Kamani, Kimberly A. Kasow, Ka Wah Chan, Stephanie J. Lee, Wing H. Leung, Victor A. Lewis, David Miklos, Machteld Oudshoorn, Effie W. Petersdorf, Olle Ringdén, Jean Sanders, Kirk R. Schultz, Adriana Seber, Michelle Setterholm, Donna A. Wall, Lolie Yu, and Michael A. Pulsipher. 2010. 'Outcomes of pediatric bone marrow transplantation for leukemia and myelodysplasia using matched sibling, mismatched related, or matched unrelated donors', *Blood*, 116: 4007.
- Teft, Wendy A, Mark G Kirchhof, and Joaquín Madrenas. 2006. 'A molecular perspective of CTLA-4 function', *Annu. Rev. Immunol.*, 24: 65-97.
- Ueda, Hironori, Joanna M. M. Howson, Laura Esposito, Joanne Heward, Snook, Giselle Chamberlain, Daniel B. Rainbow, Kara M. D. Hunter, Annabel N. Smith, Gianfranco Di Genova, Mathias H. Herr, Ingrid Dahlman, Felicity Payne, Deborah Smyth, Christopher Lowe, Rebecca C. J. Twells, Sarah Howlett, Barry Healy, Sarah Nutland, Helen E. Rance, Vin Everett, Luc J. Smink, Alex C. Lam, Heather J. Cordell, Neil M. Walker, Cristina Bordin, John Hulme, Costantino Motzo, Francesco Cucca, J. Fred Hess, Michael L. Metzker, Jane Rogers, Simon Gregory, Amit Allahabadia, Ratnasingam Nithiyananthan, Eva Tuomilehto-Wolf, Jaakko Tuomilehto, Polly Bingley, Kathleen M. Gillespie, Dag E. Undlien, Kjersti S. Ronningen, Cristian Guja, Constantin Ionescu-Tirgoviste, David A. Savage, A. Peter Maxwell, Dennis J. Carson, Chris C. Patterson, Jayne A. Franklyn, David G. Clayton, Laurence B. Peterson, Linda S. Wicker, John A. Todd, and Stephen C. L. Gough. 2003. 'Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease', *Nature*, 423: 506-11.
- Valk, Elke, Christopher E. Rudd, and Helga Schneider. 2008. 'CTLA-4 trafficking and surface expression', *Trends in immunology*, 29: 272-79.
- Vardiman, James W., Jürgen Thiele, Daniel A. Arber, Richard D. Brunning, Michael J. Borowitz, Anna Porwit, Nancy Lee Harris, Michelle M. Le Beau, Eva Hellström-Lindberg, Ayalew Tefferi, and Clara D. Bloomfield. 2009. 'The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes', *Blood*, 114: 937.
- Walker, Lucy S. K., and David M. Sansom. 2015. 'Confusing signals: recent progress in CTLA-4 biology', *Trends in immunology*, 36: 63-70.
- Wang, David G., Jian-Bing Fan, Chia-Jen Siao, Anthony Berno, Peter Young, Ron Sapolsky, Ghassan Ghandour, Nancy Perkins, Ellen Winchester, Jessica Spencer, Leonid Kruglyak, Lincoln Stein, Linda Hsieh, Thodoros Topaloglou, Earl Hubbell, Elizabeth Robinson, Michael Mittmann, Macdonald S. Morris, Naiping Shen, Dan Kilburn, John Rioux, Chad Nusbaum, Steve Rozen, Thomas J. Hudson, Robert Lipshutz, Mark Chee, and Eric S. Lander. 1998. 'Large-Scale Identification, Mapping, and Genotyping of Single-Nucleotide Polymorphisms in the Human Genome', *Science*, 280: 1077.
- Xiao, Haowen, Yi Luo, Xiaoyu Lai, Shan Fu, Jimin Shi, Yamin Tan, Jingsong He, Wanzhuo Xie, Weiyan Zheng, Li-Mengmeng Wang, Lifei Zhang, Lizhen Liu, Xiujin Ye, Xiaohong Yu, Zhen Cai, Maofang Lin, and He Huang. 2012. 'Genetic variations in T-cell activation and effector pathways modulate alloimmune responses after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with hematologic malignancies', *Haematologica*, 97: 1804-12.

- Zhang, Chao, Wei-Hua Hou, Xuan-Xi Ding, Xiong Wang, Hui Zhao, Xing-Wen Han, and Wen-Ji Wang. 2016. 'Association of Cytotoxic T-lymphocyte Antigen-4 Polymorphisms with Malignant Bone Tumors Risk A Meta-analysis', *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 17: 3785-91.
- Zheng, Hong, Catherine Matte-Martone, Hongmei Li, Britt E. Anderson, Srividhya Venketesan, Hung Sheng Tan, Dhanpat Jain, Jennifer McNiff, and Warren D. Shlomchik. 2008. 'Effector memory CD4⁺ T cells mediate graft-versus-leukemia without inducing graft-versus-host disease', *Blood*, 111: 2476-84.

8. Anhang

8.1. Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

dass ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

und dass mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

- Prof. Dr. med. Bernd Gruhn (Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, Jena)
- Susan Wittig (Hämatologisches Labor, Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, Jena)
- Dr. Thomas Lehmann (Institut für Medizinische Statistik, Informatik und Dokumentation, Jena),

dass außerdem die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Dresden, 21.07.2020

Judith Hammrich

8.2. Curriculum vitae

8.3. Danksagung

Hiermit möchte ich mich herzlich bei allen bedanken, die mich bei meiner Dissertation unterstützt haben.

An erster Stelle möchte ich Prof. Dr. Bernd Gruhn für die Vergabe des Promotionsthemas und die tatkräftige, zuverlässige Betreuung danken. Nur durch die engagierte Zusammenarbeit konnten wir zwei Publikationen veröffentlichen und diese Arbeit fertigstellen.

Anschließend möchte ich Susan Wittig für die Einarbeitung und Unterstützung im Labor danken.

Ich danke Dr. Thomas Lehmann für die kompetente Beratung bezüglich statistischer Fragestellungen.

Ein herzlicher Dank geht an die José Carreras Leukämie-Stiftung für das Interesse an meiner Forschungsfrage, das Vertrauen in meine Arbeit und die finanzielle Unterstützung im Rahmen des „José Carreras-GPHO-Promotionsstipendium für Nachwuchswissenschaftler auf dem Gebiet der pädiatrischen Hämato-Onkologie“.

Zuletzt danke ich Familie und Freunden für die mentale und liebevolle Unterstützung während meines Studiums und dem Erstellen der Dissertation.